

**Versuche zur  
elektronenmikroskopischen  
Darstellung von Immunglobulinen  
beim experimentellen Plasmocytom der Maus  
und an der Oberfläche  
von Humanlymphocyten**

**Josef Zehentbauer**

**1974**





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus dem Institut für Hämatologie  
der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung,  
Assoziation mit EURATOM, München  
(kommiss. Leiter: Priv.doz. Dr. S. Thierfelder)

VERSUCHE ZUR ELEKTRONENMIKROSKOPISCHEN DARSTELLUNG  
VON IMMUNGLOBULINEN  
BEIM EXPERIMENTELLEN PLASMOCYTOM DER MAUS  
UND AN DER OBERFLÄCHE VON HUMANLYMPHOCYTEN

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Josef Zehentbauer  
aus  
München



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

|                             |                       |
|-----------------------------|-----------------------|
| Berichterstatter:           | Prof. Dr. R. Marx     |
| Mitberichterstatter:        | Prof. Dr. H. Schwiegk |
| Dekan:                      | Prof. Dr. W. Spann    |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 9. Juli 1974          |

|          |                                                          |    |
|----------|----------------------------------------------------------|----|
| 1.       | EINLEITUNG .....                                         | 7  |
| 2.       | MATERIALIEN .....                                        | 10 |
| 2.1.     | ZELLMATERIAL .....                                       | 10 |
| 2.1.1.   | Experimentelles Plasmocytom der Maus .....               | 10 |
| 2.1.2.   | Humanlymphocyten .....                                   | 10 |
| 2.2.     | VERWENDETE ANTIKÖRPER .....                              | 10 |
| 2.2.1.   | Immunisierung .....                                      | 10 |
| 2.2.2.   | Fraktionierung .....                                     | 11 |
| 2.3.     | FERRITIN .....                                           | 11 |
| 2.3.1.   | Allgemeine Angaben .....                                 | 11 |
| 2.3.2.   | Reinigung .....                                          | 12 |
| 2.3.2.1. | Kristallisation .....                                    | 12 |
| 2.3.2.2. | Präcipitation .....                                      | 12 |
| 2.3.2.3. | Ultrazentrifugation .....                                | 13 |
| 2.4.     | KOPPLUNGSAGENTIEN .....                                  | 13 |
| 2.4.1.   | Toluen-diisocyanat .....                                 | 13 |
| 2.4.2.   | Meta-Xylylen-diisocyanat .....                           | 13 |
| 2.4.3.   | Glutaraldehyd .....                                      | 14 |
| 3.       | METHODIK .....                                           | 15 |
| 3.1.     | ZUBEREITUNG DES ZELLMATERIALS .....                      | 15 |
| 3.1.1.   | Experimentelles Plasmocytom der Maus .....               | 15 |
| 3.1.2.   | Humanlymphocyten .....                                   | 15 |
| 3.2.     | KOPPLUNGSVORGANG UND REINDARSTELLUNG DES KONJUGATS ..... | 18 |
| 3.2.1.   | Zweistufiger Kopplungsvorgang .....                      | 18 |
| 3.2.2.   | Einstufiger Kopplungsvorgang .....                       | 20 |
| 3.3.     | TESTUNG DES KONJUGATS .....                              | 21 |
| 3.3.1.   | Bestimmung der Proteinkonzentration .....                | 21 |
| 3.3.2.   | Nachweis der stattgefundenen Kopplung .....              | 22 |
| 3.3.3.   | Nachweis der erhaltenen Antikörper-Aktivität .....       | 23 |
| 3.3.3.1. | Nachweis durch die Ouchterlony-Technik .....             | 24 |
| 3.3.3.2. | Nachweis durch den passiven Hämagglutinations-Test ....  | 24 |
| 3.3.3.3. | Immunelektronen-mikroskopischer Nachweis .....           | 25 |

|                                                                                                                             | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 4. ZUSAMMENFASSENDE BEURTEILUNG<br>DER KONJUGAT-HERSTELLUNG .....                                                           | 26    |
| 4.1. AUSSAGEKRAFT DER FÜR DIE KONJUGAT-<br>BEURTEILUNG VERWENDETEN TESTMETHODEN ....                                        | 26    |
| 4.1.1. Ausbeute an Ferritin und Antikörper im Konjugat .....                                                                | 26    |
| 4.1.2. Aussage der Immunelektrophorese .....                                                                                | 27    |
| 4.1.3. Ermittlung der Antikörper-Aktivität .....                                                                            | 28    |
| 4.2. BEURTEILUNG DER VERSCHIEDENEN METHODEN<br>ZUR HERSTELLUNG DER FERRITIN-ANTIKÖRPER-<br>KONJUGATE .....                  | 28    |
| 5. IMMUNELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ANWENDUNG                                                                                  | 30    |
| 5.1. VERSUCH DER DARSTELLUNG INTRAZELLULÄRER<br>IMMUNGLOBULINE BEIM EXPERIMENTELLEN<br>PLASMOCYTOM DER MAUS .....           | 30    |
| 5.1.1. Fragestellung .....                                                                                                  | 30    |
| 5.1.2. Ergebnisse .....                                                                                                     | 31    |
| 5.1.3. Diskussion .....                                                                                                     | 33    |
| 5.2. VERSUCHE ZUR DARSTELLUNG VON IMMUNGLOBULIN-<br>REZEPTOREN AN DER OBERFLÄCHE MENSCHLICHER<br>LYMPHOCYTEN.....           | 34    |
| 5.2.1. Fragestellung .....                                                                                                  | 34    |
| 5.2.2. Ergebnisse .....                                                                                                     | 36    |
| 5.2.2.1. Ergebnisse der Kontroll-Versuche mit unspezifischen<br>Inkubationslösungen .....                                   | 36    |
| 5.2.2.1.1. Ungekoppeltes Ferritin als Inkubationslösung .....                                                               | 36    |
| 5.2.2.1.2. Vorinkubation mit dem spezifischen Antikörper .....                                                              | 38    |
| 5.2.2.2. Ergebnisse der Lymphocyten-Inkubation mit dem<br>spezifischen Konjugat .....                                       | 39    |
| 6. DISKUSSION ZUR DARSTELLUNG<br>VON IMMUNGLOBULIN-REZEPTOREN<br>AN DER OBERFLÄCHE MENSCHLICHER LYMPHOCYTEN                 | 41    |
| 6.1. UNSPEZIFISCHE FERRITIN-ANLAGERUNGEN UND<br>FERRITIN-EINSCHLÜSSE .....                                                  | 41    |
| 6.2. KONJUGAT-ANLAGERUNG TROTZ VORINKUBATION<br>MIT DEM SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPER .....                                       | 45    |
| 6.3. SPEZIFISCHE ANLAGERUNG DES KONJUGATS.....                                                                              | 46    |
| 7. BEURTEILUNG DER ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN<br>VON FERRITIN-ANTIKÖRPER-KONJUGATEN<br>IN DER IMMUN-ELEKTRONENMIKROSKOPIE..... | 50    |

|      |                                                                                                            | Seite |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| 7.1. | Geeignete Methode der Ferritin-Antikörper-Konjugat-Herstellung .....                                       | 50    |
| 7.2. | Anwendbarkeit von Ferritin-Antikörper-Konjugaten zur Lokalisierung von intrazellulärem Immunglobulin ..... | 51    |
| 7.3. | Anwendbarkeit von Ferritin-Antikörper-Konjugaten zur Lokalisierung von Oberflächen-Immunglobulin .....     | 51    |
| 8.   | ZUSAMMENFASSUNG .....                                                                                      | 53    |
| 9.   | LITERATURVERZEICHNIS .....                                                                                 | 54    |
| 10.  | ANHANG .....                                                                                               | 64    |

Abkürzungen:

|    |                   |      |                           |
|----|-------------------|------|---------------------------|
| Ag | Antigen, -e       | mXDI | meta-Xylylen-diisocyanat  |
| Ak | Antikörper        | PBS  | phosphate buffered saline |
| Ft | Ferritin          | TDI  | Toluen-diisocyanat        |
| GA | Glutaraldehyd     |      |                           |
| Ig | Immunglobulin, -e |      |                           |



## VORWORT

Für die Anregung zum Thema der vorliegenden Dissertation und für die großzügige Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit danke ich ganz besonders Herrn Privatdozenten Dr. D. Huhn, Fräulein G. Wochinger und Fräulein M. Darsow danke ich sehr für die technische Anleitung und für die umfangreiche Hilfe. Weiterhin danke ich sehr Herrn Dr. Ch. Steidle und Herrn Dr. F. Ruzicka für ihre Unterstützung, Herr Dr. M. Eulitz und Herr Dr. H. Rodt stellten für die Versuche große Mengen spezifischer Antikörper zur Verfügung und übernahmen die säulenchromatographische Fraktionierung der markierten Antikörper, wofür ich ihnen und ihren Mitarbeitern bestens danke.



## 1. EINLEITUNG

Antigene in Gewebsschnitten, auf Zelloberflächen oder im Zellinnern können durch entsprechend markierte spezifische Antikörper im Licht- oder Elektronenmikroskop sichtbar gemacht werden. Zuerst gelang es Coons (1942) Ak mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu markieren; dadurch wurden nach Anregung der Fluoreszenz durch UV-Licht die Ag-Ak-Reaktionen in mikroskopischen Präparaten demonstriert. Später verwendete Berenbaum (1959) Radiojod zur Markierung von spezifischen Ak.

Im Elektronenmikroskop wurden Ag-Ak-Komplexe an Oberflächen, beispielsweise von Viren, durch das sog. negativ-staining erkennbar gemacht (Almeida 1963); allerdings ermöglicht diese Methode lediglich die Darstellung der Konturen von Ak und Ag; dieses Verfahren hat auch sonst nur einen beschränkten Anwendungsbereich in der Immun-Elektronenmikroskopie.

Um immunologische Reaktionen in Gewebsschnitten intrazellulär oder an Zellmembranen auch im Elektronenmikroskop beobachten zu können, mußte das Ak-Molekül da es selbst nicht genügend elektronendicht ist, mit einer elektronendichten Substanz markiert werden. Singer (1959) gelang es, das elektronendichte Ft-Protein an Ak-Globuline mit Hilfe eines bivalenten Kopplungsagens zu koppeln. Auch ohne Kopplungsagens wurden mittlerweile mit hybriden Ak (Ak mit zweifacher Spezifität) Ft-Ak-Konjugate hergestellt (Hämmerling 1968). Statt Ft konjugierten Avrameas (1966) und Nakane (1966) das Enzym Peroxydase mit dem Ak-Globulin; nach der Bildung des (Peroxydase-markierten) Ag-Ak-Komplexes kann die Peroxydase dann durch histochemische Reaktionen licht- und elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden. Auch Viren wurden als elektronenoptisch sichtbare Tracer verwendet und an Ig gekoppelt (Hämmerling 1969). In ähnlicher Weise ließen sich Oberflächen-Ig durch Erythrocyten sichtbar machen, die mit entsprechenden Ak beladen wurden; dabei lagerten sich die Erythrocyten rosettenförmig um die "positiven" Zellen (Huber 1972).

Es wurde schließlich versucht, Ak-Globuline mit Schwermetallen und mit Jod zu kontrastieren. Pepe (1961) markierte Ak mit Quecksilber, Sternberger (1965)

mit Uran und Metzger (1962) mit Jod: Die Aktivität der so markierten Ig blieb kaum ausreichend erhalten. Mit elektronenmikroskopischer Autoradiographie wies Perkins (1972) lymphocytäre Oberflächen-Ig nach.

Von der Vielzahl der in der Literatur angegebenen Methoden erschien uns die Markierung von Ak mit Ft aus folgenden Gründen am erfolgversprechendsten:

- a) Ft-Ak-Konjugate ermöglichen im Gegensatz zu Peroxydase-Ak-Konjugaten eine sehr genaue Lokalisation des Ag. Jedes einzelne (mit einem Ak-Molekül konjugierte) Ft-Molekül kann im Elektronenmikroskop deutlich gesehen werden.
- b) Das Ft-Ak-Konjugat schien deshalb nicht nur zur genauen Ortsbestimmung der Ag-Ak-Reaktion geeignet, sondern diese Methode versprach auch quantitative Aussagen über die Anzahl der durch das Konjugat markierten zellulären Ig.
- c) Für die weitere intrazelluläre Lokalisation der von den Zellen aufgenommenen Ag-Ak-Komplexe erschien die Ft-Markierung besonders günstig.
- d) Zudem arbeiteten bereits eine Anzahl von Autoren weitgehend erfolgreich mit Ft-Konjugaten: zu immunelektronenmikroskopischen Untersuchungen an Viren (z. B. Rifkind 1960, Morgan 1961) und Bakterien (z. B. Hsu 1963) wurden Ft-Ak-Konjugate herangezogen; Ag an Erythrocytenoberflächen (Lee 1964) und an Lymphocytenoberflächen (Davis 1968, Aoki 1969, An 1972, Karnovsky 1972, de Petris 1972) wurden mit Hilfe von Ft-Ak-Konjugaten demonstriert; die intrazelluläre Verteilung von  $\gamma$ -Globulinen eines Mäuseplasmocytoms konnte durch Ft-gekoppelte Ak sichtbar gemacht werden (Rifkind 1962); auch Gewebs-Ag, z. B. in Nierenbiopsien, wurden mit spezifischen Ft-Ak-Konjugaten markiert (z. B. Andres 1966). Einen Überblick über die zahlreichen Anwendungen von Ft-konjugierten Ak geben u. a. Andres (1967), Sternberger (1967) und Morgan (1972).

Bei der Herstellung des Konjugats zeigten sich bei uns anfänglich einige Schwierigkeiten. So war die Konjugat-Ausbeute nach dem Kopplungsvorgang gering; es wurden dabei relativ große Mengen an Ak-Globulinen verbraucht. Die Frak-

tionierung des Konjugats aus den Reaktionsprodukten war durch Ultrazentrifugation unvollständig, gelang aber mit Hilfe der Säulenchromatographie. Der erhebliche Abfall der Ak-Aktivität während der Kopplungsreaktion (s. auch Vogt 1964) war abhängig von der Wahl des Kopplungsagens. Schließlich konnten aber Konjugate mit ausreichender Ak-Aktivität gewonnen werden.

Die Brauchbarkeit unserer Ft-Ak-Konjugate wurde an folgenden Beispielen erprobt:

Wir versuchten mit spezifischen Ft-Ak-Konjugaten die intrazelluläre Verteilung von Ig beim experimentellen Plasmocytom der Maus darzustellen. Dabei sollte u. a. die genaue Lokalisierung der Ig in den Plasmocytomzellen registriert werden. Um die Zellmembranen für das große Ft-Molekül (mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 110 Å) permeabel zu machen, mußten die Zellen durch Einfrieren und Auftauen vorsichtig vorgeschädigt werden.

Zweitens wurden die Ig-Rezeptoren an den Oberflächen von Humanlymphocyten mit Hilfe von spezifischen Ft-Ak-Konjugaten markiert; dabei wurde die Verteilung der Ft-Ak-Konjugate an der Lymphocyten-Oberfläche und ihr Auftreten in membrannahen Vakuolen beschrieben, quantitativ erfaßt und ausgewertet. Als Ak wurden dabei anti-Human-IgG (H- und L-Ketten) und anti-Human-IgG(  $\gamma$  -Ketten-spezifisch) verwendet. Bei diesen Versuchen zeigten Kontrollen mit ungekoppeltem Ft unspezifische Markierungen, die in weiteren Versuchen auch quantitativ erfaßt wurden.

## 2. MATERIALIEN

### 2.1. ZELLMATERIAL

#### 2.1.1. Experimentelles Plasmocytom der Maus

Es handelt sich um ein experimentelles IgG<sub>1</sub>- und IgG<sub>2</sub>-Plasmocytom von BALB-Mäusen. Der IgG<sub>1</sub>-, bzw. IgG<sub>2</sub>-Myelom-Proteine sezernierende Tumor wurde durch subcutane Transplantation über mehrere Generationen erhalten. Für die Versuche wurden die Tumoren 7 bis 10 Tage nach der Transplantation entnommen. (Abb. 1)

#### 2.1.2. Humanlymphocyten

Lymphocyten wurden nach der unter 3.1.2. beschriebenen Methode aus dem venösen Blut verschiedener Normalpersonen isoliert. (Abb. 3)

### 2.2. VERWENDETE ANTIKÖRPER

#### 2.2.1. Immunisierung

Die jeweils zur Immunisierung verwendeten  $\gamma$ -Globuline wurden aus entsprechenden Seren durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat (nähere Angaben s. 2.2.2.) und nachfolgende Säulenchromatographie fraktioniert. Anschließend wurde die Fraktion durch Immunelektrophorese auf ihre Reinheit überprüft.

Die Antiseren gegen Mäuse-IgG, -IgG<sub>1</sub> und -IgG<sub>2</sub> und gegen Human-IgG (H-u.L-Kette) wurden durch wöchentliche i.v.-Injektionen der jeweiligen Immunglobuline (mit Freund's Adjuvans über einen Zeitraum von mehreren Monaten) vom Kaninchen gewonnen, Antiseren gegen Kaninchen-IgG von Schafen. (Die genannten Seren wurden von den Herren Dr. Eulitz und Dr. Rodt, Ges. f. Strahlen- und Umweltforschung, Mchn, zur Verfügung gestellt.) Ein weiteres Kaninchen-anti-Maus-IgG-Serum und das Kaninchen-anti-Human-IgG ( $\gamma$ -Ketten-spezifisch)-Serum wurde von der Fa. Behring, Marburg, bezogen. Die Antiseren wurden immunelektrophoretisch geprüft, der Titer mit dem

passiven Hämagglutinations-Test bestimmt.

### 2.2.2. Fraktionierung

Die  $\gamma$ -Globulin-Fraktion (welche die spezifischen Ak enthält) wird durch Ausfällung mit Ammoniumsulfat und anschließende Chromatographie an DEAE-Cellulose (vgl. auch Amstey 1967) erhalten.

Das Antiserum wird mit gleichen Teilen aqua dest. versetzt; dieser Serumverdünnung wird gesättigte Ammoniumsulfatlösung (pH 7,2) im Verhältnis 10 : 8 zugegeben. Nach 20 min. Zentrifugation bei 10.000 r.p.m. wird das Sediment 3 x mit 45 % Ammoniumsulfatlösung (pH 7,2) gewaschen; das letzte Sediment wird in 0,02 m Phosphatpuffer (pH 8,0) aufgenommen. Diese Proteinlösung wird 3 x gegen 0,02 m Phosphatpuffer (pH 8,0) dialysiert und anschließend durch DEAE-Cellulose-Chromatographie (Gradient: 0,02 m Phosphatpuffer, pH 8,0 zu 0,3 m Phosphatpuffer, pH 7,9) in einzelne Fraktionen aufgetrennt, deren Konzentrationen photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen werden. Die Fraktionen werden durch Ultrafiltration eingeeengt und anschließend gegen PBS dialysiert. Die  $\gamma$ -Globulin-Fraktion mit dem spezifischen Ak wird immunoelektrophoretisch bestimmt, die Konzentration photometrisch und der Titer mit dem passiven Hämagglutinationstest ermittelt; die Ak-Lösung wird durch ein Millipore-Filter in sterile Gläser gegeben und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

## 2.3. FERRITIN

### 2.3.1. Allgemeine Angaben

Ft ist ein eisenhaltiges, elektronendichtes Protein mit einem Gesamtdurchmesser von 95 - 122 Å (Farrant 1954, Harrison 1963); es besteht aus einem Proteinmantel, der Mizellen aus kolloidalen Eisen-Hydroxid-Phosphat-Komplexen mit einem Durchmesser von 55 - 60 Å umschließt (Farrant 1954). Im Elektronenmikroskop scheinen die Mizellen aus Untereinheiten mit einem Durchmesser von 27 - 30 Å aufgebaut, ein Molekül Ft würde dann vier solche Untereinheiten enthalten; diese Untereinheiten sind räumlich eventuell so angeordnet,

daß sie die Eckpunkte eines gedachten Tetraeders bilden (Harrison 1959). Der Proteinanteil des Ft ist als Apoferritin bekannt (Harrison 1959). Der Eisen-Anteil des Ft beträgt ca. 20 % (Harrison 1959). Das Molekulargewicht des Ft wird meist mit ca. 750.000 angegeben (z. B. Harrison 1959, Hofmann 1963), von anderen Autoren werden allerdings z. T. wesentlich niedrigere oder höhere Werte genannt. Ft kann von verschiedenen Tieren gewonnen werden, das aus Pferde-Milz isolierte Ft (Granick 1942) ist das meist verwendete. (Weitere Angaben zu Ft s. Harrison 1964.)

### 2.3.2. Reinigung

Käufliches Pferde-Milz-Ft (Fa. Schuchardt) wurde vor Verwendung gereinigt (Rifkind 1964, Andres 1967, Schäfer 1971).

#### 2.3.2.1. Kristallisation

Eine konzentrierte Ft-Lösung wird mit 2 % Ammoniumsulfat-Lösung auf 0,1 % verdünnt, hierzu wird soviel 20 % Cadmiumsulfat gegeben bis die Ft-Lösung insgesamt 5 % Cd-Sulfat enthält. Dieses Gemisch wird ca. 2 h bei 4° C aufbewahrt, anschließend bei 2.000 g l h zentrifugiert. Der braune Überstand wird verworfen, das Sediment (Kristalle) mit 2 % Ammoniumsulfat resuspendiert und wieder w. o. zentrifugiert. Das Sediment wird verworfen und der Überstand erneut in 5 % Cd-Sulfatlösung w.o. rekristallisiert, aufbewahrt und zentrifugiert. Das Sediment wird im Lichtmikroskop geprüft; wenn nicht ausschließlich die deutlich erkennbaren orange-braunen Ft-Kristalle zu sehen sind, muß die Rekristallisierung wiederholt werden.

#### 2.3.2.2. Präzipitation

Die reinen Ft-Kristalle werden in soviel 2 % Ammoniumsulfat gelöst bis etwa die Ausgangsmenge erreicht wird. Ungefähr die gleiche Menge an gesättigtem Ammoniumsulfat wird hinzugefügt, und dadurch wird das Ft in amorpher Form innerhalb von ca. 1 h bei 4° C präzipitiert. Danach erfolgt die Zentrifugation w. o., und die Präzipitation wird 2 x wiederholt, um alle freien Cd-Ionen zu entfernen. Das zuletzt erhaltene Präcipitat wird in wenig aqua dest. gelöst,

dann 12 h gegen fließendes  $H_2O$  und 12 h gegen 0,05 m Phosphatpuffer, pH 7,5, dialysiert.

### 2.3.2.3. Ultrazentrifugation

Das Dialysat wird bei 110.000 g 2 h zentrifugiert, die oberen 3/4 des Überstandes werden verworfen, der Rest wird in wenig PBS gelöst.

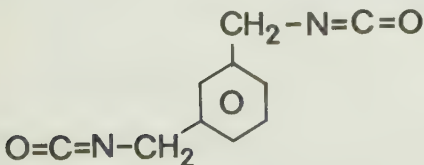
Von käuflichem bereits vorgereinigtem Pferde-Milz-Ft (Fa. Calbiochem, Los Angeles, und Fa. Serva, Heidelberg) wurde vor Verwendung eine kleine Probe in 5 % Cd-Sulfat 1 x ausgefällt (Mengenangaben s. o.) und auf Reinheit geprüft.

## 2.4. KOPPLUNGSAGENTIEN

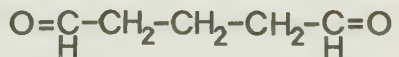
Proteine können durch niedermolekulare Agentien mit zwei funktionellen Gruppen aneinander gekoppelt werden. Folgende Substanzen wurden von uns als Kopplungsagentien verwendet:

2.4.1. Toluendiisocyanat (TDI, von der Fa. Merck, Darmstadt), eine klare, farblose Flüssigkeit, Gefrierpunkt ca.  $5^{\circ}C$ , wird von Singer (1961) als geeignetes Kopplungsagens bezeichnet.

2.4.2. Meta-Xylylen-diisocyanat (mXDI, Fa. Calbiochem), eine klare, farblose Flüssigkeit, die vor Luft, Feuchtigkeit und Licht geschützt werden muß, um eine Polymerisation zu vermeiden. mXDI wurde zuerst von Singer (1959) verwendet, Borek (1961) bezeichnet es als das geeignetste Agens zur Herstellung von Ft-Ak-Konjugaten.



Meta-Xylylen-diisocyanat



Glutaraldehyd

2.4.3. Glutaraldehyd (GA, Fa. Schuchardt), eine klare, farblose Flüssigkeit ist bei Zutritt von Luft sehr unbeständig (Lagerung in Stickstoff-Atmosphäre bei 4<sup>0</sup> C). Er hat die Eigenschaft, Proteine aneinander zu binden (Richards 1968) und ist als Agens zur Kopplung von Ak an "Markierungsproteine" gut geeignet (mit Enzymen: Avrameas 1970a, mit Ft: Siess 1971, Wagner 1972, Neauport-Sautes 1972). Die wäßrige 25 % GA-Lösung (Fa. Schuchardt) wurde vor Verwendung destilliert, die Reinheit wurde mit dem UV-Spektrometer überprüft (Absorptionsmax. bei 280 nm), die Konzentration wurde durch Ausfällen, Trocknen und Wägen bestimmt (Fahimi 1965, Anderson 1967, Fahimi 1968). (Die Destillation und Konzentrationsbestimmung des GA wurde von Herrn Dr. Zeitler, Ges. f. Strahlen- und Umweltforschung, Mchn, durchgeführt.)

### 3. METHODIK

#### 3.1. ZUBEREITUNG DES ZELLMATERIALS

##### 3.1.1. Experimentelles Plasmocytom der Maus.

Ausgangsmaterial ist beim experimentellen Plasmocytom der Maus ein als ganzes entnommener und dann in sehr kleine Teile zerschnittener Tumor. Das Zellmaterial wird sofort nach Entnahme in kalte PBS gelegt. Um eine Zellsuspension zu erhalten, wird das Zellmaterial mit Hilfe einer einfachen Vorrichtung durch ein Nylon-Gaze gesaugt (Filtrierflasche, Wasserstrahlpumpe) oder mit einem Glasstab durchgedrückt. Anschließend wird die entstandene Zellsuspension bei ca. 2.000 g zentrifugiert, das Sediment in kalter, phosphatgepufferter 5 % Formalinlösung resuspendiert und nach 15 min. (bei einigen Versuchen nach 10 bzw. 20 min ) 3 x in PBS gewaschen. Nach der letzten Zentrifugation wird das Sediment dünnsschichtig auf einen Metallspatel aufgetragen, in einem CO<sub>2</sub>(Trockeneis)-Äthanol-Gemisch eingefroren und anschließend in PBS wieder aufgetaut (Rifkind 1962, de Petris 1963, 1965). Nach erneutem Zentrifugieren wird das Sediment, also Zellen eines IgG<sub>1</sub>- bzw. IgG<sub>2</sub>-Plasmocytoms, mit dem in PBS gelösten spezifischen Konjugat inkubiert; das Konjugat besteht aus an Ft gekoppelten anti-IgG<sub>1</sub>-Ak, bzw. anti-IgG<sub>2</sub>-Ak oder anti-IgG-Ak vom Kaninchen (Konzentration des Ft und des Ak im Konjugat s. 3.2.2.). Die Inkubation dauert 15 min. (bei einigen Versuchen 10 bzw. 20 min.) bei 25° C. Anschließend wird das Zellmaterial in PBS 3 x gewaschen, 1 h bei 5° C in Osmiumsäure postfixiert, in aufsteigender Alkoholreihe dehydriert, eingebettet (in Maraglas) und geschnitten; die Schnitte werden meist mit 2 % Uranylacetat 1 h und mit Bleicitrat 30 min kontrastiert.

In insgesamt vier Versuchen (jeweils mit Kontrollversuchen, s. 5.1.1.) wurden jedes Mal mehrere hundert Zellen ausgewertet.

##### 3.1.2. Humanlymphocyten

Für unsere Versuche war es notwendig, eine möglichst reine Lymphocyten-Fraktion zu gewinnen, wobei während des Isolierungsverfahrens die Lymphocyten

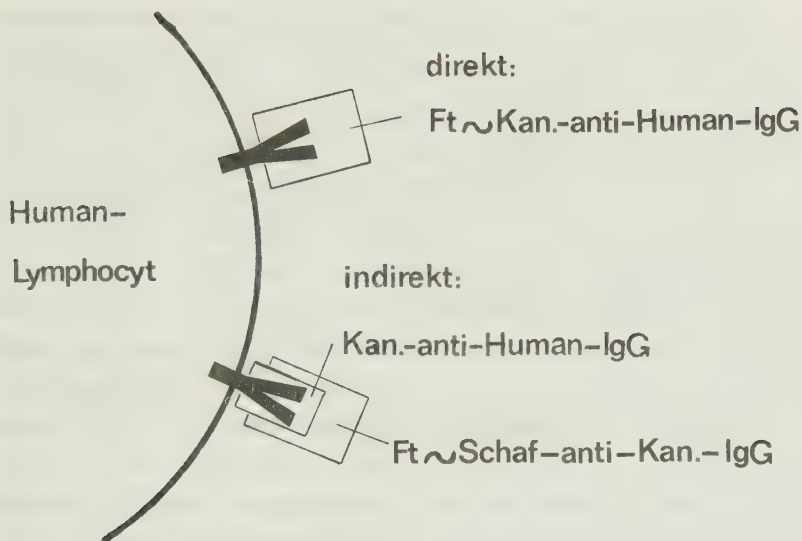
möglichst geschont werden sollten. Die von Rabinowitz (1964) und Ciresa (1967) beschriebene Methode und das von Otto (1970) angegebene Verfahren erwiesen sich dabei am brauchbarsten.

Für die Lymphocyten-Isolierung nach Ciresa (1967) werden zuerst Leukocyten isoliert; dabei wird venöses Blut mit Plasmagel und Heparin (z. B. 40 : 13 : 0,6 ml) versetzt; bei 37° C sedimentieren sich dann nach ca. 45 min die Erythrocyten ab. Der Leukocyten-reiche Überstand wird durch Zentrifugation von Thrombocyten befreit. Eine sterile Säule (Länge 16 cm, Ø 15 mm) wird zwischen zwei Glaswollagen (Dicke je 1 cm) mit kleinen Glasperlen (Ø 0,1 mm) gefüllt, mit der Leukocyten-Suspension beschickt und bei 37° C 30 min inkubiert. Während dieser Inkubation findet die Adhäsion der Granulocyten und Monocyten an die Glasperlen statt. Danach wird die Säule mit zellfreiem Plasma durchspült (Elutionsgeschw. ca. 50 Tropfen/min ); im Eluat erscheinen außer den Lymphocyten noch Erythrocyten, die durch Hämolyse in hypotoner Lösung eliminiert werden.

Die Lymphocyten-Isolierung nach der von Otto (1970) beschriebenen Methode basiert auf der Differential-Zentrifugation mit Hilfe des Jodamids Uromiro<sup>R</sup>: 25 ml einer Uromiro<sup>R</sup>-Verdünnung (z. B. 22,35 ml Uromiro 380<sup>R</sup> + 100 ml aqua dest.) werden mit heparinisiertem Blut (0,6 ml Heparin auf 100 ml Blut) langsam überschichtet und mit 1.600 r.p.m. bei 20° C 30 min zentrifugiert. Dabei sedimentieren Erythrocyten und Granulocyten; die Lymphocyten sammeln sich in der Trennschicht zwischen Jodamid und Serum als weißer Ring, werden abpipetiert und 3 x in PBS gewaschen.

Mit dem ersteren Verfahren werden fast ausschließlich Lymphocyten isoliert; die Ausbeute ist aber gering und der Zeitaufwand groß. Mit dem zuletzt genannten Isolierungsvorgang erhält man Lymphocyten und Monocyten, das Verfahren ist sehr zeitsparend.

Die Darstellung der Lymphocyten-Ig-Rezeptoren erfolgte durch direkte und indirekte Markierung:



Bei der direkten Methode werden die isolierten und gewaschenen Lymphocyten direkt mit dem spezifischen Konjugat inkubiert. Bei der indirekten Methode werden den Lymphocyten zuerst die ungekoppelten spezifischen Ak zugegeben; nachdem die überschüssigen Ak durch Waschen entfernt worden sind, werden die Lymphocyten erneut inkubiert mit einem an Ft gekoppelten Ak gegen das  $\gamma$ -Globulin des Tieres, von dem die spezifischen Ak stammen.

Etwa 10 Millionen Lymphocyten werden jeweils mit ca. 0,5 ml in PBS gelöstem spezifischem Konjugat inkubiert; das Konjugat besteht aus an Ft gekoppelten anti-Human-IgG (H- u. L-Kette) oder anti-Human-IgG (  $\gamma$  -Ketten-spezifisch) vom Kaninchen (Konzentration des Ft und des Ak im Konjugat s. 3.2.2.). Jede Inkubation dauert 30 min, die Temperatur ist bei verschiedenen Versuchen  $4^{\circ}$ ,  $20^{\circ}$  bzw.  $37^{\circ}$  C. Nach jeder Inkubation werden die Zellen jeweils 3 oder 7 x (bei verschiedenen Versuchen) gewaschen. Die Lymphocyten werden nach der Inkubation in 1,5 % GA fixiert, 15 min bei  $4^{\circ}$  C. Dann folgt Dehydrierung, Einbettung etc. (vgl. 3.1.1.).

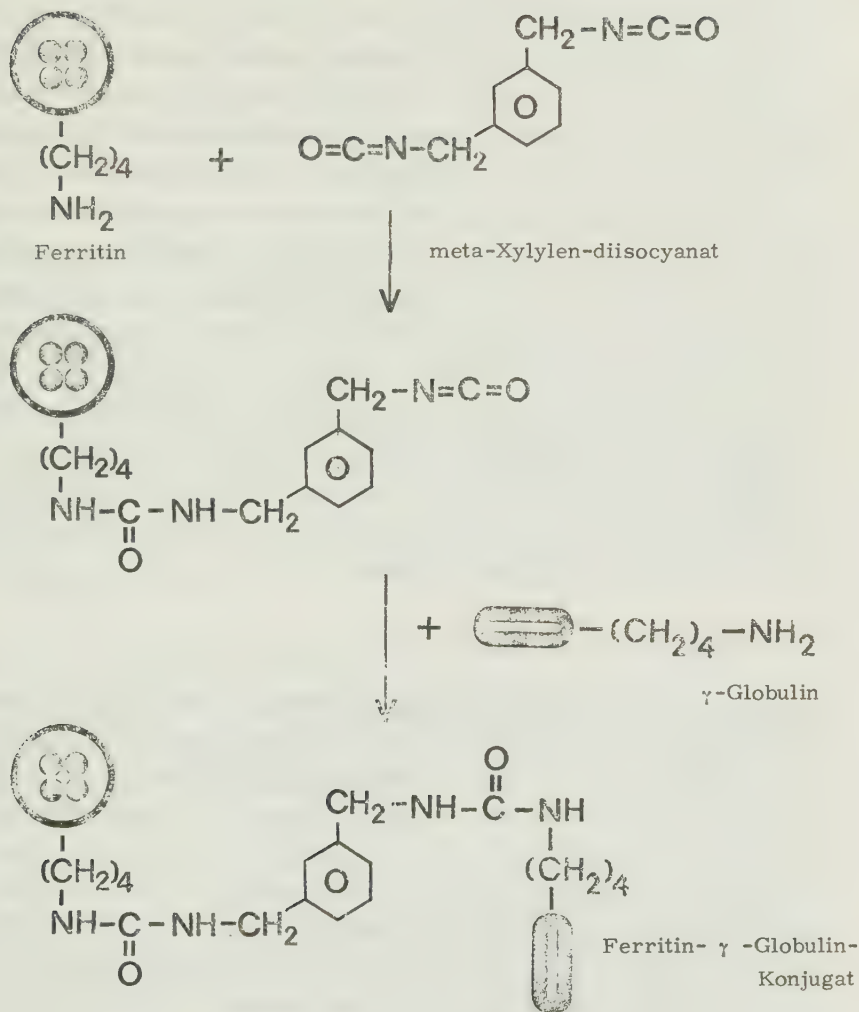
In insgesamt fünf Versuchen (jeweils mit Kontrollversuchen, s. 5.2.1.) wurden jedes Mal mehrere Hundert Zellen ausgewertet.

### 3.2. KOPPLUNGSVORGANG UND REINDARSTELLUNG DES KONJUGATS

Die Proteine des Konjugats, die Ft- und die Ak-Moleküle, werden durch niedermolekulare Agentien mit zwei funktionellen Gruppen unter entsprechenden Reaktionsbedingungen aneinander gekoppelt. Dabei wird entweder zuerst das Markierungsprotein Ft mit dem Kopplungsagens konjugiert und anschließend das Ak-Protein an diesen Komplex gekoppelt ("zweistufig") oder beide Proteine reagieren gleichzeitig mit dem Kopplungsagens ("einstufig"). Bei der Herstellung der Konjugate gingen wir weitgehend nach der zweistufigen von Singer zuerst beschriebenen Methode vor, mit mXDI und TDI als Kopplungsagentien (Singer 1959, bzw. 1961) und nach der einstufigen Methode mit GA als Kopplungsagens (Siess 1971, Wagner 1972, Neauport-Sautes 1972). Die Fraktionierung des Konjugats aus dem Kopplungsgemisch geschah nach dem zweistufigen Kopplungsvorgang vorwiegend durch Ultrazentrifugation, nach dem einstufigen Kopplungsvorgang ausschließlich durch Säulenchromatographie. Der säulenchromatographischen Trennung wurde trotz des größeren Aufwands der Vorzug gegeben, v. a. weil ungekoppelte Ft- und Ak-Moleküle aus der Konjugatfraktion separiert werden konnten.

#### 3.2.1. Zweistufiger Kopplungsvorgang

Für den zweistufigen Kopplungsvorgang können neben den genannten TDI und mXDI noch eine Anzahl weiterer Agentien mit zwei funktionellen Gruppen verwendet werden (Borek 1961). Bei der Verwendung von TDI als Kopplungsagens werden 5 ml einer 1,5 % Ft-Lösung in PBS mit 0,1 ml TDI versetzt, danach in einem Eisbad 30 min mit einem Magnetrührer kräftig bewegt und anschließend bei 5°C 30 min bei 2.000 g zentrifugiert. Das Sediment wird verworfen, der Überstand 1 h bei 0°C aufbewahrt, dann mit 5 ml einer 1,5 %  $\gamma$ -Globulin-Lösung in Borat-Puffer (pH 9,5) vermischt und bei 37°C 1 h leicht bewegt. Anschließend wird das Gemisch 12 h gegen 0,1 m Ammoniumcarbonat pH 9,2, dialysiert, danach mit 15 ml PBS versetzt und bei 100.000 g 3 h zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Sediment in 2 ml 0,01 m Ammoniumcarbonat gelöst und 12 h gegen 0,01 m Ammoniumcarbonat und dann 12 h gegen PBS dialysiert.



Bei dem von vielen Autoren beschriebenen Konjugationsvorgang mit mXDI als Kopplungsagens (Singer 1959, Rifkind 1964, Andres 1967, Schäfer 1971 u. a.) wird eine 3,75 % Ft-Lösung in PBS mit 0,3 m Boratpuffer (pH 9,5) im Verhältnis 2 : 1 gemischt, dazu werden pro 100 mg Ft 0,1 ml mXDI gegeben und das Gemisch 45 min mit einem Magnetrührer bei  $0^\circ \text{C}$  bewegt und danach bei  $5^\circ \text{C}$  30 min mit 4.000 g zentrifugiert. Das Sediment (nicht reagiertes mXDI)

wird verworfen und der Überstand 1 h bei 0° C aufbewahrt. Zu diesem Überstand (Ft-mXDI) werden pro 100 mg Ft 25 - 100 mg  $\gamma$ -Globulin als 2 - 3 % Lösung in PBS gegeben. (Bei verschiedenen Versuchen wurde ein Ft:Ig-Gewichtsverhältnis von 4 : 1, meist ein Verhältnis von 2 : 1 oder 1 : 1 gewählt.) Zu diesem Gemisch wird nun soviel 0,3 m Boratpuffer hinzugefügt bis wieder ein 0,1 m Boratpuffer entsteht. Das entstandene Gemisch wird bei 5° C 48 h mit dem Magnetrührer bewegt und anschließend 12 h gegen 0,1 m Ammoniumcarbonat, pH 9,2, dialysiert (um die nicht reagierten funktionellen Gruppen des mXDI zu zerstören) und 12 h gegen PBS dialysiert. Das Gemisch wird dann zuerst 60 min bei 4.000 g zentrifugiert (um geringe während der Reaktion entstandene Präcipitate zu sedimentieren) und der Überstand bei 120.000 g 4 h ultrazentrifugiert. Das hier entstandene Sediment wird in PBS resuspendiert und erneut ultrazentrifugiert; dieser Vorgang wird insgesamt 3 - 4 x ausgeführt, um nicht konjugiertes  $\gamma$ -Globulin (im Überstand) vom Ft-Ig-Komplex (im Sediment) zu trennen. Zuletzt wird das Sediment in soviel PBS gelöst, daß eine ca. 2 % Protein-Lösung entsteht.

### 3.2.2. Einstufiger Kopplungsvorgang

In einem einstufigen Kopplungsvorgang gelang es Sri Ram (1963) mit Difluordinitrophenylsulfon eine Konjugation durchzuführen. Ebenfalls in einer einstufigen Reaktion konnten mit GA als Kopplungsagens Globuline mit Enzymen (Nakane 1966, Avrameas 1966) und mit Ft (Siess 1971, Wagner 1972, Neuport-Sautes 1972) markiert werden. Bei der Herstellung der Ft-Ak-Konjugate mit GA wurden von uns einige Reaktionsbedingungen variiert. Dabei ergab folgendes Vorgehen die größte Ausbeute an Konjugat: Ft und  $\gamma$ -Globulin, beide in PBS gelöst, werden im Gewichtsverhältnis 1 : 1 so zusammengegeben, daß eine Proteinkonzentration von ca. 25 mg/ml entsteht. Zu dieser Lösung wird unter ständigem Schütteln 0,5 % GA (in PBS) getropft, insgesamt 1,8 mg GA für 100 mg Protein. Dieses Gemisch wird bei 25° C 90 min leicht bewegt, danach 2 x 12 h gegen PBS bei 5° C dialysiert und anschließend 30 min bei 30.000 g zentrifugiert (um bei der Reaktion entstandene große Polymere zu sedimentieren). Aus dem Übestand wird durch Säulenchromatographie (vgl. Amstey 1967) mit Sephadex G 200 das Konjugat von den ungekoppelten Proteinen

(Ft und Ig) getrennt (Säulenlänge 150 cm,  $\emptyset$  1,5 cm; 0,1 m Tris-HCl-Puffer, pH 8,0; Durchflußgeschw. 5 ml/h). Dies geschieht unter photometrischer Registrierung bei 280 nm. Zuerst erscheint das Konjugat im Eluat, dann freies Ft und schließlich gut abgegrenzt ungekoppeltes  $\gamma$ -Globulin. Die Konjugat-Fraktion wird danach konzentriert (Filtration unter  $N_2$ -Druck und Unterdruck-Dialyse durch Kollodiumbehälter) und anschließend durch einen Millipore-Filter gedrückt und in sterilen Gläsern bei 4°C aufbewahrt.

Verschiedene pH-Werte zwischen 6,8 und 7,2 hatten keinen Einfluß auf die Konjugat-Ausbeute. Bei variierten GA-Konzentrationen, 1,5, 1,8, 2,0 und 2,5 mg pro 100 mg Protein, konnte mit 1,8 mg die höchste Menge an Ft-Ig-Komplexen erzielt werden. Wir bevorzugten ein Gewichtsverhältnis Ft:Ig von 1 : 1. Das Konjugat wurde für die Inkubation auf eine Ft-Konzentration von 1,5 - 8 mg/ml gebracht (verschiedene Inkubationslösungen, meistgewählte Konzentration der Inkubationslösung 1,5 - 2,5 mg/ml); die Ig-Konzentration entsprach bei einem Ft:Ig-Verhältnis von 1 : 1 im Ausgangsgemisch meist der Ft-Konzentration oder lag geringfügig darüber.

### 3.3. TESTUNG DES KONJUGATS

Nach Fraktionierung und Konzentrierung des Konjugats muß die Proteinkonzentration bestimmt werden, der Nachweis der stattgefundenen Kopplung und der erhaltenen Ak-Aktivität erbracht werden.

#### 3.3.1. Bestimmung der Protein-Konzentration

Die Proteinkonzentration des Konjugats wird photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt, wobei nicht zwischen Ft und  $\gamma$ -Globulin unterschieden werden kann. Auch bei anderen Wellenlängen überschneidet sich die Extinktion von Ft und  $\gamma$ -Globulin, wobei bei 350 nm die gemessene Extinktion fast ausschließlich durch die Ft-Konzentration bestimmt wird. Da die dem Reaktionsgemisch zugesetzte Gesamtmenge  $\gamma$ -Globulin bekannt ist und die Menge des ungekoppelten  $\gamma$ -Globulins nach der Fraktionierung photometrisch bestimmt werden kann, ist ein guter Anhalt für den  $\gamma$ -Globulin-Anteil gegeben, der im Konjugat gebunden ist (unberücksichtigt bleibt hierbei u. a. der

$\gamma$ -Globulin-Anteil, der in großen Polymeren gebunden, abzentrifugiert und verworfen wird). Die Konzentration des Ft kann außer der oben genannten photometrischen Bestimmung wegen der intensiven braunen Farbe durch Farbvergleich mit bekannten Konzentrationen (Verdünnungsreihe) annähernd bestimmt werden. (Proteinkonzentration in der Inkubationslösung s. 3.2.1. und 3.2.2.)

### 3.3.2. Nachweis der stattgefundenen Kopplung

Die erfolgte Kopplung des Ft mit dem Ak kann immunelektrophoretisch nachgewiesen werden.

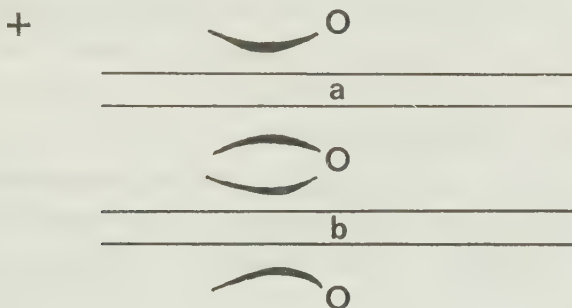
Zur Immunelektrophorese (vgl. auch Grabar 1953, Scheidegger 1955, Williams 1960) werden Objektträger zuerst mit Haftagar, dann mit einer 1,5 % Agarlösung in Veronalpuffer (pH 8,6) beschichtet (3 ml pro Plättchen). Nach dem Erkalten werden drei Löcher aus dem Agar gestanzt und jeweils 5  $\mu$ l der zu testenden Substanzen (s. u.) eingefüllt. Die elektrophoretische Wanderung erfolgt über 90 min bei 250 V und 4,5 mA. Danach werden zwischen den Löchern zwei Rinnen aus dem Agar gestanzt und mit entsprechenden Immunseren (s. u.) gefüllt. Nach 20stündiger Inkubation in feuchter Kammer können die entstandenen Präcipitate abgelesen werden. Anschließend wird nicht präcipitiertes Protein durch mehrstündige Lagerung in 1 % NaCl-Lösung herausgespült und die Präcipitate werden dann mit Sudanschwarz gefärbt.

Nach der Ultrazentrifugation bzw. nach der Säulenchromatographie des Koppungsgemisches werden die gewonnenen Fraktionen (s. 3.2.1. und 3.2.2.) zur elektrophoretischen Wanderung in die Stanzlöcher gefüllt, in die Rinnen als Immunseren Antiferritin und ein anti-  $\gamma$  -Globulin-Serum gegen das Tier, von dem die verwendeten Ak stammen. Die Konjugation des Ft mit dem  $\gamma$ -Globulin gilt als gelungen, wenn das (gekoppelte)  $\gamma$ -Globulin zur Anode gewandert ist (und nicht wie freies  $\gamma$ -Globulin zur Kathode) und wenn das Präcipitat des  $\gamma$ -Globulins mit dem Präcipitat des Ft übereinstimmt. Es wird die Fraktion verwendet, bei der außer den genannten Kriterien nachgewiesen ist, daß kein ungekoppeltes (zur Kathode wanderndes)  $\gamma$ -Globulin vorhanden ist; eine geringe Menge ungekoppeltes Ft wurde hingenommen.

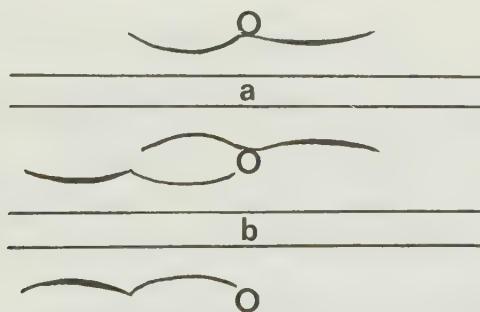
In den Stanzlöchern: Das Konjugat (ohne freies Ft und ohne freies  $\gamma$ -Globulin)

a: jeweiliges anti-  $\gamma$  -Globulin-Serum

b: Anti-Ferritin



In den Stanzlöchern: Eine Fraktion, die freies Ft (wandert am weitesten zur Anode), freies  $\gamma$ -Globulin (wandert zur Kathode) und ein wenig Konjugat enthält (unbrauchbar).



### 3.3.3. Nachweis der erhaltenen Antikörper-Aktivität

Entscheidend für die Brauchbarkeit des Konjugats ist, daß nach der Kopplung und nach den übrigen Vorgängen noch genügend Ak-Aktivität erhalten bleibt. Die Ak-Aktivität des ungekoppelten und des gekoppelten Ak wurde durch Titration der (in einer Verdünnungsreihe vorliegenden) Ak-Lösung gegen das

entsprechende Ag bestimmt, einmal mit der Ouchterlony-Technik, zum anderen mit dem passiven Hämagglutinationstest. Außerdem konnte die Aktivität immunoelektronenmikroskopisch nachgewiesen werden durch Erythrocyten, die mit dem jeweiligen Ag beladen wurden und durch Lymphocyten mit Ig-Rezeptoren.

#### 3.3.3.1. Nachweis durch die Ouchterlony-Technik

Die Herstellung der hierzu verwendeten Agar-Platten entspricht im wesentlichen der für die Immunelektrophorese beschriebenen Zubereitung (s. 3.3.2., vgl. auch Ouchterlony 1958). In die Agar-Platten werden Löcher in folgender Anordnung gestanzt:



In das zentrale Stanzloch wird das entsprechende Ag gegeben, in die übrigen Löcher wird in einer Verdünnungsreihe der ungekoppelte Ak bzw. das Konjugat eingefüllt. Nachdem die Agarplatten 24 h in eine feuchte Kammer gelegt werden, können die Präzipitin-Banden abgelesen werden.

#### 3.3.3.2. Nachweis durch den passiven Hämagglutinationstest

Zunächst müssen die Erythrocyten mit dem entsprechenden Ag beladen werden (vgl. Avrameas 1969, Onkelinx 1969): Dreimal mit PBS gewaschene, gepackte Erythrocyten (jeweils 10 min bei 2.000 r.p.m.) werden aus frischem defibrinierten Hammelblut gewonnen. Das Ag-Protein, mit dem die Erythrocyten beladen werden sollen, muß vorher absorbiert werden gegen Hammel-Erythrocyten. Zur Kopplung der Erythrocyten mit dem Ag werden zu 20 ml PBS zuerst 2 ml einer absorbierten Ag-Protein-Lösung gegeben, dann 1 ml

gepackte Erythrocyten (ca. 50 mg Protein pro 1 ml gepackte Erythrocyten) und schließlich unter leichtem Schütteln tropfenweise 3 ml 2,5 % GA (Lösung in PBS). Anschließend wird das Gemisch 90 min bei Zimmertemperatur leicht bewegt, bei 1.500 r.p.m. 5 min zentrifugiert und das Sediment 3 x mit PBS gewaschen und danach in 10 ml PBS resuspendiert; (dazu werden 0,15 ml 0,35 % Polyvinylpyrrolidon und 2 Tropfen Merthiolat gegeben).

Zum passiven Hämagglutinationstest wird (unter Verwendung von Hämagglutinations-Platten der Fa. Greiner, Nürtingen) von der Ak-Lösung (bzw. vom Konjugat) mit PBS eine Verdünnungsreihe angesetzt (in einer geometrischen Folge 1 : 1, 1 : 2, 1 : 4 usw., wobei jedes Röhrchen insges. 200  $\mu$ l Flüssigkeit enthält). Der Inhalt jedes Röhrchens der Verdünnungsreihe wird mit 10  $\mu$ l der Erythrocyten-Suspension (in der die Erythrocyten mit dem entsprechenden Ag beladenen sind, s. o.) vermischt. Nach frühestens 2 h kann der Titer abgelesen werden. Bei der Ermittlung des Titers eines Konjugats wird zur Kontrolle der Titer des ungekoppelten Ak in annähernd gleicher Konzentration bestimmt und der Titer des Normalserums des Tieres, das die Ak gebildet hat.

#### 3.3.3.3. Immunelektronenmikroskopischer Nachweis

Die mit dem entsprechenden Ag beladenen Erythrocyten (s. 3.3.3.2.) werden mit dem Konjugat inkubiert. Jeweils 0,1 ml der Erythrocyten und 0,1 ml des 1 : 1, 1 : 4 oder 1 : 8 verdünnten Konjugats werden 30 min leicht bewegt; die Inkubationstemperatur beträgt 4° C. Nach 6- bis 7maligem Waschen mit PBS und der Postfixierung in Osmiumsäure folgt die Zubereitung für die Elektronenmikroskopie. Bei erhaltener Ak-Aktivität im Ft-Ak-Konjugat war im Elektronenmikroskop zu sehen, daß die Konjugate an der Erythrocyten-Oberfläche aufgereiht waren.

Über die Inkubation der Lymphocyten mit dem Konjugat nach der direkten und indirekten Methode s. 3.1.2..

#### 4. ZUSAMMENFASSENDE BEURTEILUNG DER KONJUGAT - HERSTELLUNG

##### 4.1. AUSSAGEKRAFT DER FÜR DIE KONJUGATBEURTEILUNG VERWENDETEN TESTMETHODEN

##### 4.1.1. Ausbeute an Ferritin und Antikörper im Konjugat

Mit den von uns angewandten Bestimmungsmethoden (s. 3.3.1.) können nur annähernd quantitative Aussagen über die Konzentration des Ft und des Ak im Konjugat gemacht werden. Nach mehrfach wiederholten Kopplungsversuchen unter vergleichbaren Bedingungen haben wir jedoch jeweils annähernd konstante Konzentrationen des Ak und des Ft im Konjugat ermittelt:

| Kopplungsagens | Ft:Ig-Gew.Verh. im Ausgangsgemisch | Im Konjugat gebundenes Ft, bzw. Ig (in % der Ausgangsmenge) |           |
|----------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------|
|                |                                    | Ft                                                          | Ig        |
| mXDI           | 1 : 1                              | ca. 70 %                                                    | ca. 15 %  |
| GA             | 1 : 1                              | 20 - 25 %                                                   | 20 - 25 % |
| GA             | 2 : 1                              | ca. 30 %                                                    | 20 - 25 % |
| GA             | 1 : 2,5                            | 20 - 25 %                                                   | ca. 30 %  |

Bei Verwendung von GA (1,8 mg pro 100 mg Protein) als Kopplungsagens und einem Ft:Ig-Gew.-Verhältnis von 1 : 1 im Ausgangsgemisch beträgt das im Konjugat gebundene Ft bzw. Ig jeweils 20 - 25 % der Ausgangsmenge. Bei einem Ft:Ig-Verhältnis von 2 : 1 ist etwas über 30 % der Ausgangsmenge von Ft im Konjugat gebunden; der Ig-Anteil bezogen auf die Ausgangsmenge bleibt zwischen 20 und 25 % unverändert, er steigt erst auf ca. 30 % bei einem Ft:Ig-Verhältnis von 1 : 2,5 (wobei der Ft-Anteil unter 25 % liegt). Mit mXDI als Kopplungsagens und einem Ft:Ig-Verhältnis von beispielsweise 1 : 1 im Ausgangsgemisch beträgt das im Konjugat gebundene Ft ca. 70 % der Ausgangsmenge, die entsprechende Zahl für das  $\gamma$ -Globulin liegt ungefähr bei 15 % (vgl. auch Easton 1962). Bei Isliker (1964) waren nach der Ft-Ak-Konjugation ebenfalls nur 10 - 20 % der Ak markiert.

Ausgehend von einem Molekulargewicht für Ft von 750.000 und für  $\gamma$ -Globulin von 160.000 müßte das Ft:Ig-Gewichtsverhältnis von 4,7 : 1 im Ausgangsgemisch genügen um die Kopplung von jeweils einem Molekül Ft mit einem Molekül  $\gamma$ -Globulin zu ermöglichen. Deshalb werden von vielen Autoren ähnliche Gewichtsverhältnisse für die Kopplungsreaktion genannt (z. B. von Rifkind 1964 mit mXDI als Kopplungsagens). Bei steigender Ft- und konstanter  $\gamma$ -Globulin-Menge im Ausgangsgemisch wird nach unseren Beobachtungen bis zu einem 3 : 1 bis 4 : 1-Verhältnis zunehmend mehr Ft im Konjugat gebunden, v. a. bei mXDI als Kopplungsagens. Man kann dadurch zu der Vorstellung kommen, daß an ein Ft-Molekül nur wenige Moleküle  $\gamma$ -Globulin, vielleicht nur eines, konjugiert werden. Umgekehrt wird bei konstanter Ft- und steigender  $\gamma$ -Globulin-Menge im Ausgangsgemisch zunehmend mehr  $\gamma$ -Globulin gebunden, kaum aber mehr Ft (vgl. auch Siess 1971, Neuport-Sautes 1972). Hierbei werden zwar wohl die einzelnen Ft-Moleküle mit mehreren Ig-Molekülen beladen, die Gesamtzahl der beladenen Ft-Moleküle nimmt allerdings kaum zu. Da auch der bei jeder Konjugation zu beobachtende Titer-Verlust (s. u.) bei einem Konjugat mit hohem Ig-Anteil im Ausgangsgemisch kaum geringer war, verwendeten wir bei der Kopplungsreaktion mit GA als Kopplungsagens meist ein Gew. Verhältnis Ft:Ig wie 1 : 1, bzw. 1 : 2 (bei mXDI als Kopplungsagens meist ein 1 : 1-Verhältnis).

#### 4.1.2. Aussage der Immunelektrophorese

Der Nachweis der stattgefundenen Kopplung durch die Immunelektrophorese ist möglich, da die einzelnen Produkte der Kopplungsreaktion (Konjugat, Ft-Kopplungsagens-Zwischenprodukt, freies Ft und freies Ig etc.) verschiedene Wanderungsgeschwindigkeiten haben (genaue Angaben s. Borek 1961). Ungekoppeltes Ig wandert unter den genannten Versuchsbedingungen (s. 3.3.2.) eindeutig zur Kathode und ist damit klar vom Konjugat (das zur Anode wandert) abzugrenzen. Konjugate mit mXDI als Kopplungsagens wandern weiter zur Anode als Konjugate mit GA als Kopplungsagens. GA-Konjugate mit größerer Menge gebundenem Ig wandern weniger weit zur Anode als solche mit geringerer Menge gebundenem Ig. Die immunelektrophoretischen Kriterien für die Verwendbarkeit eines Konjugats sind unter 3.3.2. genannt.

#### 4.1.3. Ermittlung der Antikörper-Aktivität

Von den unter 3.3.3. genannten Methoden zum Nachweis der Ak-Aktivität ist der passive Hämagglutinationstest den übrigen Tests überlegen:

##### a) Empfindlichkeit

Sehr geringe Ak-Aktivität, die mit der Ouchterlony-Technik nicht mehr zu ermitteln ist, kann häufig noch durch den passiven Hämagglutinationstest nachgewiesen werden. (Der immunelektronenmikroskopische Nachweis der Ak-Aktivität kann bei niedertitrigen Konjugaten eventuell durch unspezifische Ft-Anlagerungen etwas erschwert werden, die Ak-Aktivität ungekoppelter Ig kann hiermit ohnehin nicht bestimmt werden.)

##### b) Halbquantitative Aussagen

Eine Aussage über die Höhe der Ak-Aktivität ist beim immunelektronenmikroskopischen Nachweis eingeschränkt und bei der Ouchterlony-Technik nur über wenige Stufen möglich, im Gegensatz zum passiven Hämagglutinationstest.

##### c) Geringer Arbeitsaufwand

Der passive Hämagglutinationstest ist einfacher und schneller durchzuführen als die beiden anderen Tests.

Für die Konjugation werden nach Möglichkeit relativ hochtitrige Ig verwendet, da während der Kopplungsreaktion mit erheblichem Titerverlust zu rechnen ist (vgl. auch Sri Ram 1963, Amstey 1967 und Stoltzner 1972); nach einigen Kopplungsreaktionen war eine Ak-Aktivität im Konjugat kaum mehr nachweisbar (vgl. auch Vogt 1964). Der Titerverlust bei Kopplungsreaktionen mit mXDI betrug einmal 40 %, die übrigen Male 70 bis 90 %, bei Kopplungsreaktionen mit GA maximal 35 %, meist nur 20 - 25 %.

#### 4.2. BEURTEILUNG DER VERSCHIEDENEN METHODEN ZUR HERSTELLUNG DER Ft-Ak-KONJUGATE

Ft-Ig-Konjugate sollen möglichst viele der nachfolgend genannten Kriterien erfüllen, damit sie sinnvoll in immun-histochemischen Versuchen eingesetzt

werden können.

- a) Während der Kopplungsreaktion muß das entstehende Konjugat in Lösung bleiben, und es sollen möglichst keine Präcipitate entstehen.
- b) Die Bindung zwischen Ft und dem Ig soll stabil sein.
- c) Die Ausbeute an Konjugat muß genügend hoch sein.
- d) Die Fraktionierung der bei der Kopplungsreaktion entstandenen Komponenten muß möglich sein, v. a. muß ungekoppeltes Ig und ungekoppeltes Ft entfernt werden können.
- e) Die Ak-Aktivität des Ig darf während der Kopplungsreaktion nicht zu signifikant absinken, die Spezifität muß erhalten bleiben.
- f) Material- und Zeitaufwand sollen möglichst gering sein.

Bei der Kopplungsmethode mit mXDI entstehen während der Kopplungsreaktion geringe Präcipitate (s. auch Singer 1961), nicht aber bei der Konjugation mit TDI und mit GA. Die Bindung zwischen den Proteinen scheint zumindest teilweise kovalent zu sein (bei der mXDI-Kopplung s. Singer 1961). Die im Konjugat gebundene Menge Ft bezogen auf die Ausgangsmenge ist im mXDI-Konjugat höher als im GA-Konjugat, wo aber vergleichsweise mehr Ig gebunden ist (s. 4.1.1.). Unabhängig von der Art der Kopplungsreaktion läßt sich sowohl das TDI-, mXDI- als auch das GA-Konjugat gut von den übrigen Komponenten im Kopplungsgemisch isolieren. Sehr entscheidend für die Brauchbarkeit eines Konjugats ist, daß die Ak-Aktivität des konjugierten Ig noch ausreichend erhalten bleibt. Wie bereits erwähnt (4.1.3.) ist der Verlust an Ak-Aktivität bei der mXDI-Kopplung größer als bei Kopplung durch GA. Dies und der geringe Material- und Zeitaufwand waren dafür ausschlaggebend, daß wir GA als Kopplungssagens vorzogen.

## 5. IMMUNELEKTRONENMIKROSKOPISCHE ANWENDUNG

### 5.1. VERSUCH DER DARSTELLUNG INTRAZELLULÄRER IMMUNGLOBULINE BEIM EXPERIMENTELLEN PLASMOCYTOM DER MAUS

#### 5.1.1. Fragestellung

Die Brauchbarkeit von Ft-Ak-Konjugaten zur Lokalisation intrazellulärer Ig wurde am Modell des experimentellen Plasmocytom der Maus getestet.

In Plasmazellen wurden Ak lichtmikroskopisch u. a. durch Immunofluoreszenz (Coons 1955) und durch Radioautographie (Berenbaum 1959) nachgewiesen. Für die elektronenmikroskopische Lokalisation intrazellulärer Ig bestehen v. a. folgende Möglichkeiten:

- a) Versuchstiere werden gegen einen Tracer (z. B. Peroxydase oder Ft) immunisiert. Danach werden Plasmazellen (und Lymphocyten), die Ak gegen das Immunogen enthalten, mit dem jeweiligen Ag inkubiert; dabei lagert sich der Tracer den intrazellulären Ak an (mit Peroxydase: Leduc 1968, Avrameas 1970a, Bouteille 1971, Hajdu 1972, Saito 1973, mit Ft: Wellensiek 1964, de Petris 1963 und 1965).
- b) Außerdem können intrazelluläre Ig durch gegen sie gerichtete, an Peroxydase- oder Ft-gekoppelte Ak lokalisiert werden (Avrameas 1968, bzw. Rifkind 1962, Easton 1962 an Krebs-Ascites-Tumor-Zellen).

Für uns kam nur die zuletzt genannte Möglichkeit in Betracht, weil wir in weiteren Versuchen die Methode mit klinischer Fragestellung an menschlichen Zellen anwenden wollten. Dabei erschien uns Ft als Markierungsprotein geeig-  
neter als Peroxydase, da mit Ft eine exaktere Lokalisation möglich ist als mit Peroxydase. Zudem kann bei Verwendung von Peroxydase-markierten Ak die endogene Peroxydase-Aktivität bei myeloischen Zellen die Auswertung der Befunde erschweren. Die Ft-Ak-Konjugate haben allerdings den Nachteil, daß die Zellmembranen für das Ft-Molekül impermeabel sind (Easton 1962). Deshalb wurden die Zellen nach der Fixierung durch Einfrieren und Wiederauftauen leicht beschädigt, um die Permeabilität zu erhöhen (s. 3.1.1.).

Zur Darstellung intrazellulärer Ig eignet sich als Modell das experimentelle Plasmocytom der Maus v. a. deshalb, weil hier eine weitgehend einheitliche Zellpopulation mit definitivem, intrazellulärem Ig vorliegt. Die meist charakteristische Eigenschaft dieser Tumoren, größere Mengen eines monoklonalen Ig zu synthetisieren und freizusetzen (Baumal 1971), bleibt während der Tumor-Transplantation erhalten (Potter 1960 a u. b). Im Mechanismus der Ig-Synthese bestehen zwischen Zellen eines experimentellen Mäuse-Plasmocytoms und normalen Mäuse-Plasmazellen wahrscheinlich kaum Differenzen.

Bei unseren Versuchen wurde intrazelluläres Ig von Zellen eines  $\text{IgG}_1$ - und eines  $\text{IgG}_2$ -synthetisierenden Mäuseplasmocytoms mit an Ft gekoppelten spezifischen Ak (vgl. 3.1.1.) nachgewiesen. Bei jedem Versuch wurden als Kontrolle die Plasmocytomzellen mit ungekoppelten Ft inkubiert oder mit einem unspezifischen Ft-Konjugat.

### 5.1.2. Ergebnisse

Bei einem großen Teil der Plasmocytomzellen waren nach dem Einfrieren und Auftauen die entstandenen Membranschäden im Elektronenmikroskop deutlich zu sehen; die Zellorganellen blieben weitgehend erhalten. Das Einfrieren in einem  $\text{CO}_2$ -(Trockeneis)-Äthanol-Gemisch (Rifkind 1962) war für die Zellen schonender als das Einfrieren in einer Reihe anderer kalter Flüssigkeiten (z. B. Freon/flüssiger Stickstoff). An der Ultrastruktur der Plasmocytomzellen (s. auch Parsons 1961, Ebbesen 1969) war am auffallendsten das meist hochentwickelte endoplasmatische Retikulum (E.R.) mit (artifiziiell bedingten) unterschiedlich weiten Lumina, in denen sich feingranuliertes, unregelmäßig elektronendichtes Material befand. Auch der perinukleäre Raum war häufig erweitert. Bei einer großen Anzahl von Zellen waren relativ viele freie Ribosomen vorhanden. Sehr deutlich zu erkennen waren die Viren, die in unterschiedlicher Menge bei fast allen Zellen beobachtet wurden (Abb. 1). Der Entwicklungsstand der verschiedenen Zellen war nicht einheitlich.

Bei unseren Versuchen zeigten etwa zwei Drittel der Zellen, die mit dem spezifischen Ft-Ak-Konjugat inkubiert wurden, Ft-Einlagerungen; in den nicht mit einem Konjugat oder einer Ft-Lösung inkubierten Zellen waren keine Ft-Moleküle

zu sehen.

Ft-Ak-Konjugate fanden sich v. a. im endoplasmatischen Retikulum, weniger im perinukleären Raum. Nicht nur im rauhen endoplasmatischen Retikulum kamen die Konjugate vor, sondern beispielsweise auch in Zisternen, die nicht mit Ribosomen besetzt waren. Auch außerhalb des endoplasmatischen Retikulums beobachteten wir bei unseren Versuchen z. T. eine erhebliche Anzahl von Ft-Ak-Konjugaten. Häufig waren diese Konjugate dem rauhen endoplasmatischen Retikulum "von außen" angelagert, also den aufgereihten Ribosomen benachbart. Nicht selten konnten die Ft-Ak-Konjugate auch im übrigen Cytoplasma gesehen werden (Abb. 2). Der Nachweis von Ig im Golgi-Apparat von Plasmocytom-Zellen gelang nicht regelmäßig. An Mitochondrien und an den zahlreich vorhandenen Viren waren keine Ft-Ak-Konjugate zu finden. Der Zellkern blieb bei den meisten Zellen weitgehend frei von Konjugaten.

Bei mehreren Versuchen waren einige extrazellulär gelegene Zellfragmente von dichten Ft-Ak-Konjugaten belagert. An der Oberfläche der Plasmocytomzellen bildeten die Konjugate nur selten eine kontinuierliche Reihe, meist waren sie nur als einzelne Partikel an der Zelloberfläche zu sehen.

Bei den IgG<sub>1</sub>- und den IgG<sub>2</sub>-Plasmocytomen zeigte die Art der intrazellulären Markierung (mit dem jeweils spezifischen Konjugat, bzw. mit dem Ft-anti-IgG-Ak-Konjugat) keine signifikanten Unterschiede.

In den Kontrollversuchen (mit ungekoppelten Ft oder einem unspezifischen Ft-Konjugat als Inkubationslösung) zeigten weniger Plasmocytomzellen Ft-Einlagerungen als in den Hauptversuchen (mit einem spezifischen Konjugat als Inkubationslösung). Die unspezifischen Ft-Einlagerungen waren nur sehr selten im endoplasmatischen Retikulum zu finden, häufig waren sie im Cytoplasma an einer Stelle gesammelt. Die Anzahl der unspezifisch aufgenommenen Ft-Moleküle war geringer als die Zahl der intrazellulär vorhandenen Ft-Ak-Konjugate der Hauptversuche. Die Plasmocytomzellen der Hauptversuche konnten von denen der Kontrollversuche unterschieden werden, quantitative Aussagen waren allerdings kaum möglich.

### 5.1.3. Diskussion

In den Ig-synthetisierenden Plasmocytomzellen konnten wir mit Ft-Ak-Konjugaten Ig im endoplasmatischen Retikulum nachweisen. Bei normalen Plasmazellen wird von zahlreichen Autoren mit verschiedenen elektronenmikroskopischen Methoden Ig im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert (z. B. de Petris 1965, Leduc 1969, Avrameas 1970 b, Rifkind 1962 an Mäuse-Plasmocytomzellen und Easton 1962 an Krebs-Ascites-Tumorzellen).

Die bei unseren Versuchen zu beobachtende geringere Markierung im perinukleären Raum durch Ft-Ak-Konjugate könnte evtl. dadurch bedingt sein, daß es sich um reifere Zellformen handelt. Nach Saito (1973) sind bei reifen Plasmazellen im perinukleären Raum keine Ig nachzuweisen.

Eine beträchtliche Zahl von Ft-Ak-Konjugaten fanden wir im freien Cytoplasma (Abb. 2), teilweise dem endoplasmatischen Retikulum angelagert. Avrameas (1968) und Leduc (1969) berichteten, daß bei Plasmazellen Peroxydase-Ak-Konjugate auch die Ribosomen deutlich markieren, welche dem endoplasmatischen Retikulum oder den Zisternen des endoplasmatischen Retikulum anlagern; das übrige Cytoplasma ist hier allerdings frei von Peroxydase. Lediglich Wellensiek (1964) beschrieb, daß in Plasmazellen Ft (als Ag, nach Immunisierung) im Cytoplasma erscheint, auch der Nucleus beinhaltet bei manchen dieser Zellen mehrere Ft-Partikel, was wir auch bei unseren Versuchen beobachten konnten.

Nach den Experimenten von Bouteille (1971) und Hajdu (1972) scheint das meiste Protein, das im rauen endoplasmatischen Retikulum gebildet wird, in den Golgi-Apparat zu "wandern". Bei allen Plasmazellen waren bei Saito (1973) im Golgi-Apparat Ig nachweisbar; nur bei einem Teil der von uns verwendeten Plasmocytomzellen konnten Ft-Ak-Konjugate im Golgi-Apparat entdeckt werden. Andere Zellorganellen und die Viren wurden erwartungsgemäß nicht von Ft-Ak-Konjugaten markiert.

An normalen Plasmazellen sind Oberflächen-Ig nachzuweisen (Gonatas 1972), auch die Oberflächen von Plasmocytomzellen lassen sich mit Fluorescein-anti-Ig-Antisera deutlich anfärben (Rabellino 1971). Nach Bhoopalam (1972) zeigen sogar Lymphocyten von Plasmocytom-Mäusen an ihrer Oberfläche das jewei-

lige tumorspezifische Ig. Wir konnten an den Plasmocytomzellen meist nur vereinzelte Ft-Ak-Konjugate feststellen (Abb. 2).

Bei den Kontrollversuchen sind die unspezifischen Ft-Einlagerungen wahrscheinlich auf die vorausgegangene Zellschädigung (Einfrieren und Wiederauftauen) zurückzuführen, dadurch konnten ungekoppelte Ft-Moleküle oder unspezifische Konjugate ins Zellinnere gelangen und bei den nachfolgenden Waschvorgängen nur unvollständig entfernt werden. Obwohl sich die unspezifischen von den spezifischen Einlagerungen unterschieden, schränkten diese Befunde natürlich eine genaue qualitative und eine quantitative Auswertung ein.

Zusammenfassend kann man sagen, daß das Ft-Ak-Konjugat häufiger im endoplasmatischen Retikulum als perinukleären Raum zu sehen war, aber es war auch auf Ribosomen, die dem endoplasmatischen Retikulum anliegen und teilweise im übrigen Cytoplasma verteilt. Wieweit gerade die letzte Beobachtung auf Artefakte zurückzuführen ist, konnte nicht näher eruiert werden. Der Golgi-Apparat blieb häufig frei von Ft-Ak-Konjugaten, Mitochondrien und Viren waren nie mit Ft-Ak-Konjugaten besetzt. Zelloberflächen waren vereinzelt markiert. Das Auftreten von Globulinen in den beschriebenen Zellorganellen der Mäuse-Plasmocytomzellen stimmt mit der von verschiedenen Autoren angegebenen Verteilung von Ig in normalen Plasmazellen weitgehend überein. Die von uns zur Darstellung der intrazellulären Ig verwendeten Ft-Ak-Konjugate eignen sich wegen der bei den Kontrollversuchen auftretenden unspezifischen Markierungen nur beschränkt.

## 5.2. VERSUCHE ZUR DARSTELLUNG VON IMMUNGLOBULIN-REZEPTOREN AN DER OBERFLÄCHE MENSCHLICHER LYMPHOCYTEN

### 5.2.1. Fragestellung

Ein Teil der Lymphocyten aus dem peripheren Blut, aus Lymphknoten und Milz haben deutlich nachweisbare Immunglobulin-Rezeptoren an ihrer Oberfläche. Der Anteil dieser Lymphocyten an der Gesamtzahl der Lymphocyten des peripheren Bluts wird durchschnittlich mit 30 bis 40 % angegeben (Grey 1971, Wilson 1971, Asamer 1972, Huber 1972), allerdings werden auch wesentlich

niedrigere Werte genannt (Coombs 1969, Pernis 1971). Die Lymphocyten mit deutlich nachweisbaren Ig-Rezeptoren sind sog. B-Lymphocyten, sie stammen aus dem Knochenmark; ein fehlender Nachweis von Ig-Rezeptoren kann als Kennzeichen "thymusabhängiger" T-Lymphocyten angesehen werden (Grey 1971, Basten 1972). Ig können von den Lymphocyten selbst synthetisiert werden (Huber 1967, Furth 1969, Vivetta 1972) und es ist unwahrscheinlich, daß es sich bei den Oberflächen-Ig-Rezeptoren lediglich um adsorbierte Proteine handelt (vgl. auch die zusammenfassende Darstellung von Sell 1968).

Zum elektronenmikroskopischen Nachweis lymphocytärer Ig-Rezeptoren eignen sich v. a. folgende Methoden:

- a) Ein gegen die Rezeptoren gerichteter Ak wird an einen elektronenoptisch sichtbaren Tracer (z. B. Ft, Peroxydase, Viren) gekoppelt.
- b) Statt des Tracers kann ein Isotop (z. B. Radiojod) verwendet werden, mit anschließender elektronenmikroskopischer Autoradiographie (z. B. Bankhurst 1971, Perkins 1972).
- c) Erythrocyten können mit gegen die Rezeptoren gerichtete Ak beladen werden und so als "Tracer" dienen (z. B. Huber 1972).

Da wir v. a. die zahlenmäßige Verteilung der Ig-Rezeptoren auf der Lymphocyten-Oberfläche, deren Temperaturabhängigkeit und die Phagocytosetätigkeit der Lymphocyten untersuchen wollten, schienen uns Ft-Ak-Konjugate zur Markierung der Ig-Rezeptoren aus folgenden Gründen am geeignetsten:

- a) Jedes einzelne Ft-Molekül kann genau lokalisiert werden. Dadurch wird
- b) eine quantitative Auswertung möglich.
- c) Bei Verwendung von Peroxydase-markierten Ak kann die endogene Peroxydase-Aktivität bei Knochenmarkszellen stören. Dagegen waren bei nicht mit Ft behandelten Lymphocyten keine Ft-Einlagerungen zu erwarten.

Gerade für die Untersuchung der intrazellulären Aufnahme und der weiteren Verarbeitung von zunächst membrangebundenen, markierten Ig-Komplexen schien uns aus den gen. Gründen die Verwendung von Ft-Ak-Konjugaten am erfolgversprechendsten.

Die einzelnen Schritte der Inkubation der Lymphocyten mit den jeweiligen Ak-, bzw. Konjugatlösungen nach der direkten und indirekten Methode wird oben beschrieben (s. 3.1.2.). Als Kontrolle wurden folgende Parallelversuche durchgeführt:

- a) Statt des Konjugats wurden die Lymphocyten mit einer Ft-Lösung (also ohne gekoppelten Ak) inkubiert. Die Konzentration des Ft in dieser Lösung entsprach der Konzentration der im Hauptversuch verwendeten Konjugatlösung (s. 3.2.2.). In zusätzlichen Versuchen wurden Inkubationsdauer und -temperatur und die Anzahl der anschließenden Waschvorgänge variiert.
- b) Die Lymphocyten wurden zuerst mit dem Ak inkubiert, der mit dem im Konjugat gekoppelten identisch ist, dann wurden die Lymphocyten gewaschen (s. 3.1.2.) und anschließend mit dem Konjugat inkubiert. Die Ak-Konzentration war in beiden Inkubationslösungen annähernd gleich (vgl. 3.2.2.).

Beide Kontrollen wurden sowohl bei Versuchen nach der direkten, wie auch bei solchen nach der indirekten Methode durchgeführt. Lymphocytenanzahl, Inkubationszeit etc. entsprechen den Angaben vom Hauptversuch (s. 3.1.2.).

## 5.2.2. Ergebnisse

Die Feinstruktur der Lymphocyten war unter den genannten Versuchsbedingungen nach der Inkubation sowohl mit dem Konjugat als auch mit den Kontrolllösungen gut erhalten (Abb. 3). In Human-Lymphocyten, die nicht mit Ft oder einem Konjugat inkubiert wurden, wurden von uns keine Ft-Einlagerungen gefunden.

### 5.2.2.1. Ergebnisse der Kontroll-Versuche mit unspezifischen Inkubationslösungen

#### 5.2.2.1.1. Ungekoppeltes Ft als Inkubations-Lösung

Die Ergebnisse der Hauptversuche, in denen Lymphocyten mit dem spezifischen Konjugat inkubiert werden, können nur dann interpretiert werden, wenn gleichzeitig die unspezifische Anlagerung von ungekoppeltem Ft an Lymphocyten

und die Aufnahme von ungekoppeltem Ft durch die Lymphocyten ausreichend untersucht werden.

Bei allen Kontrollversuchen, in denen Lymphocyten mit einer Ft-Lösung inkubiert wurden, zeigte ein großer Teil der Zellen an ihrer Oberfläche unspezifische Ft-Anlagerungen. Meist waren die Ft-Moleküle in Form von nicht zusammenhängenden Aggregaten an der Zelloberfläche zu sehen, wobei nur wenige dieser Moleküle unmittelbar der Zellmembran angelagert waren (Abb. 3, 4). Sehr viel seltener waren einzelne Ft-Moleküle an der Zelloberfläche zu beobachten. Zwischen den Ft-Molekülen und der äußeren Schicht der Zellmembran war mindestens ein Abstand von 100 Å.

Manche Lymphocyten zeigten unabhängig von der Inkubationstemperatur in Membraneinstülpungen und in membrannahen Vakuolen Ft-Moleküle (Abb. 5), bei vielen Lymphocyten waren mikrovilliähnliche Fortsätze zu sehen (Abb. 4).

Wegen der unspezifischen Anlagerung von Ft an die Zelloberfläche haben wir bei der Inkubation der Lymphocyten mit der Ft-Lösung einige Versuchsbedingungen variiert:

- Die Inkubation erfolgte bei 4° oder 37° C,
- teilweise wurde 10 % Rinderalbumin-Lösung zugegeben,
- 3- oder 7fache Waschvorgänge in PBS wurden durchgeführt.

Die Ft-Konzentration in der Inkubationslösung betrug mindestens 1,5 mg/ml, die übrigen Versuchsbedingungen blieben unverändert.

Trotz veränderter Versuchsbedingungen waren bei allen Versuchen auf der Zellmembran und intrazellulär unspezifische Ft-Ansammlungen zu beobachten. Weder das mehrmalige Waschen, noch die verschiedene Inkubationstemperatur konnte das Ergebnis nennenswert ändern. Die Anlagerungen von Ft an die Zelloberfläche waren bei Lymphocyten und Monocyten ähnlich, lediglich bei einer Inkubationstemperatur von 37° C war bei Monocyten (und Thrombocyten) im Gegensatz zu Lymphocyten das Ft fast ausschließlich in Vakuolen und Cytosomen zu sehen (Abb. 11).

Sowohl Lymphocyten, die nach den Methoden von Ciresa (1967) oder Otto (1970) isoliert wurden (s. 3.1.2.), als auch solche, die gar nicht fraktioniert wurden,

zeigten unspezifische Ft-Anlagerungen.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die quantitative Auswertung einiger Versuche, bei denen die Anzahl der unspezifisch markierten Lymphocyten besonders hoch war. Es wurden bei jedem Versuch mehrere Hundert Lymphocyten ausgewertet.

|                   | % der Lymphocyten ohne Anlagerung | % der Lymphocyten mit Ft-Anlagerungen auf der Zellmembran |             |            |            |                | % der Lymphocyten mit intrazell. Ft |           |
|-------------------|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------|------------|------------|----------------|-------------------------------------|-----------|
|                   |                                   | <5 Partikel                                               | >5 Partikel | <3 Aggreg. | >3 Aggreg. | kontinuierlich | Vakuolen                            | Cytosomen |
| Ft 40° C +Albumin | 12                                | 3                                                         | 1           | 53         | 31         | -              | 29                                  | -         |
| Ft 40° C          | 11                                | 7                                                         | -           | 45         | 36         | 1              | 12                                  | 2         |
| Ft 37° C          | 10                                | 7                                                         | 1           | 35         | 47         | -              | 10                                  | 1         |

Die Anzahl der Lymphocyten ohne Anlagerung von ungekoppelten Ft schwankte bei verschiedenen Versuchen (unter vergleichbaren Versuchsbedingungen): in einigen Versuchen waren bis zu 25 % der Lymphocyten ohne unspezifische Ft-Anlagerungen.

#### 5.2.2.1.2. Vorinkubation mit dem spezifischen Ak

Auch nach der Vorinkubation mit dem spezifischen Ak (s. 5.2.1., Kontrollversuch b) zeigten die Lymphocyten-Oberflächen Ft-Markierungen. Das Verteilungsmuster der Ft-Partikel auf den Lymphocyten-Oberflächen entsprach am ehesten den Ergebnissen, wie wir sie nach der Inkubation mit dem spezifischen Konjugat erhielten. Die quantitative Auswertung ergab lediglich einen geringen Rückgang der Oberflächen-Markierung gegenüber der Markierung, wie sie nach der Konjugat-Inkubation zu sehen war.

### 5.2.2.2. Ergebnisse der Lymphocyten-Inkubation mit dem spezifischen Konjugat

Nach der Inkubation der Lymphocyten mit dem spezifischen Konjugat zeigten bei der Verwendung von anti-Human-IgG (H- u. L-Kette) als Ak knapp 80 % der Lymphocyten Ft-Anlagerungen, bei anti-Human-IgG ( $\gamma$ -kettenspezifisch) zeigten nur etwa die Hälfte der Lymphocyten Ft-Anlagerungen. Für jeden Versuch wurden jeweils mehrere Hundert Lymphocyten ausgewertet.

| spezif. Ak<br>Konjugat                                   | % der Lymphocyten<br>ohne An-<br>lagerung | % der Lymphocyten mit<br>Ft-Anlagerungen auf der Zellmembran |                |               |               |                     | % der Lymphocyten mit<br>intrazell. Ft |                |
|----------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------|---------------|---------------|---------------------|----------------------------------------|----------------|
|                                                          |                                           | <5<br>Partikel                                               | >5<br>Partikel | <3<br>Aggreg. | >3<br>Aggreg. | kontinu-<br>ierlich | Vaku-<br>olen                          | Cyto-<br>somen |
| anti-Human-<br>IgG (H- u.<br>L-Kette)                    | 21                                        | 7                                                            | 24             | 17            | 22            | 9                   | 18                                     | -              |
| anti-Human-<br>IgG<br>( $\gamma$ -ketten-<br>spezifisch) | 46                                        | 13                                                           | 22             | 7             | 8             | 4                   | 14                                     | 1              |

Zwischen der direkten und indirekten Methode bei der Inkubation (s. 3.1.2.) bestanden bei weiteren Versuchen keine nennenswert unterschiedlichen Ergebnisse. Bei einer Inkubationstemperatur von 4<sup>0</sup> C fanden wir vorwiegend eine mehr diffuse Verteilung der Ft-Ak-Konjugate an der Lymphocyten-Oberfläche, bei 20<sup>0</sup> bzw. 37<sup>0</sup> C waren die Ft-Ak-Konjugate häufiger an einem Ort der Zelloberfläche lokalisiert.

Während bei den Kontrollversuchen mit Ft-Lösung die Ft-Moleküle v. a. in Form von Aggregaten an der Lymphocyten-Oberfläche zu sehen waren (s. 5.2.2.1.1.), waren bei den Versuchen mit Konjugat-Inkubation am häufigsten einzelne Ft-Moleküle der Lymphocytenmembran direkt angelagert. Bei dem Kontrollversuch mit Ft-Lösung zeigte von einigen Hundert ausdifferenzierten Lymphocyten nur ein einziger an seiner Oberfläche eine kontinuierliche Ft-Schicht; dagegen beobachteten wir nach der Konjugat-Inkubation eine zusammenhängende Ft-Schicht bei 4 bis 9 % der Lymphocyten (Abb. 7, 8, 9).

Große, zusammenhängende Ft-Ak-Konjugat-Ansammlungen waren im Gegensatz zu den Kontrollversuchen auf der Oberfläche einiger Lymphocyten zu sehen, allerdings selten (Abb. 12). Der Abstand der Ft-Moleküle von der Zellmembran betrug wie bei den Kontrollversuchen mindestens  $100 \text{ \AA}$ , jedoch lagen bei den spezifischen Markierungen die Ft-Moleküle meist innerhalb eines dichten, wolkigen Materials (Abb. 6, 7).

Bei der Konjugat-Inkubation unter Verwendung von anti-Human-IgG (H-u. L-Kette) als spezifischem Ak (direkte oder indirekte Methode) war im Vergleich zu  $\gamma$ -kettenspezifischen Ak die Anzahl der markierten Lymphocyten höher, und die Oberflächen der markierten Lymphocyten waren dichter mit Ft-Ak-Konjugaten besetzt.

Einige Lymphocyten zeigten unabhängig von der Inkubationstemperatur Ft-haltige Membraneinstülpungen, bei vielen fanden sich mikrovilliähnliche Fortsätze (Abb. 12). Bei 14 bis 18 % der Lymphocyten erschienen Ft-Ablagerungen in Vakuolen, sehr selten in Cytosomen (Abb. 10).

## 6. DISKUSSION ZUR DARSTELLUNG VON IMMUNGLOBULIN-REZEPTOREN AN DER OBERFLÄCHE MENSCHLICHER LYMPHOCYTEN

### 6.1. UNSPEZIFISCHE FERRITIN-ANLAGERUNGEN UND FERRITIN-EINSCHLÜSSE

Lymphocyten, die mit einer Ft-Lösung oder mit einem unspezifischen Konjugat inkubiert werden oder die mit dem ungekoppelten spezifischen Ak vorinkubiert werden bevor sie mit dem spezifischen Konjugat reagieren können, sollten (nach dem Waschen der Zellen) an ihrer Oberfläche keine Ft-Anlagerungen zeigen. In unseren Versuchen war ein großer Teil der Lymphocyten nach der Inkubation in "Kontrolllösungen" markiert (Abb. 3, 4). Diese Markierung konnte aber meist von der spezifischen Konjugat-Anlagerung differenziert werden (s. 5.2.2.2.).

Bisher sind nur wenige Arbeiten erschienen über die Darstellung von Oberflächen-Ig bei Lymphocyten mit Hilfe von an Ft gekoppelten Ak. Bei manchen dieser Untersuchungen wurden allerdings keine Kontrollversuche mit ungekoppelten Ft als Inkubationslösung durchgeführt oder es fehlten genaue quantitative Angaben über die Ergebnisse der Kontrollversuche. Außerdem enthalten diese Arbeiten meist keine oder nur ungenaue Angaben über die Ft-Konzentration in der Inkubationslösung. Dabei nimmt nach den Ergebnissen von Bretton (1972) und nach eigenen Versuchen mit steigender Konzentration des Ft in der Konjugatlösung auch der Grad der Markierung an der Zelloberfläche zu. So können die Veröffentlichungen verschiedener Autoren nur bedingt miteinander verglichen werden.

Die folgende Übersicht bringt die Ergebnisse unspezifischer Reaktionen aus Arbeiten über die Darstellung von Oberflächen-Ig an Lymphocyten unter Verwendung von Ft-markierten Ak.

| Autor                          | Inkubations-<br>lösung des Kon-<br>trollversuchs | Zellmaterial                                                                    | Ergebnis<br>(unspezifische<br>Reaktionen)                                                                                          |
|--------------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| An 1972                        | Ft-Lösung                                        | b <sub>4</sub> Kaninchen-<br>Lymphocyten mit<br>anti-b <sub>4</sub> -Ak beladen | 8 % markiert                                                                                                                       |
| Aoki 1969                      | unspezifisches<br>Ft-Ak-Konjugat                 | Mäuse-Lympho-<br>cyten                                                          | "controls nega-<br>tive"                                                                                                           |
| Davis und<br>Silverman<br>1968 | unspezifisches<br>Ft-Ak-Konjugat                 | Mäuse-Lympho-<br>cyten                                                          | "nonspecific<br>staining ...<br>similar to those<br>observed by<br>Möller"(bei<br>Möller 1961 bis<br>15 % unspezif.<br>Reaktionen) |
| Karnovsky<br>1972              | Ft-Lösung                                        | Mäuse- u. Ratten-<br>lymphocyten aus der<br>Milz                                | "no labeling"                                                                                                                      |
| de Petris<br>1972              | Ft-Lösung                                        | Mäuse-Lymphocyten                                                               | 10 % markiert,<br>doch nur 1 - 3<br>Moleküle oder<br>kleine "clumps"                                                               |
| Stoltzner<br>1972              | unspezif. Konjugat<br>(anit-platelet-Ig-Ft)      | Humanlymphocyten                                                                | "no significant<br>labeling"                                                                                                       |

Für die unspezifischen Anlagerungen konnte von uns bisher keine alleinige Ur-  
sache ausgemacht werden; im folgenden werden einige mögliche Ursachen  
diskutiert.

a) Eine Schädigung der Zellmembran kann zur Folge haben, daß sich unspezi-  
fische Konjugate (Davis 1968) oder Ft-Moleküle an die Membran anlagern.

- Die Feinstruktur der Lymphocyten war gut erhalten nach der von uns meist  
angewandten Lymphocyten-Isolierung durch Differentialzentrifugation mit  
Hilfe von Uromiro<sup>R</sup> (s. 3.1.2.). Unspezifische Anlagerungen zeigten auch  
Lymphocyten, die nicht nach diesem Verfahren, sondern nach der Metho-  
de von Ciresa (1967, s. 3.1.2.) oder gar nicht fraktioniert wurden. (Die  
so gewonnenen Lymphocyten waren ebenfalls morphologisch intakt.)

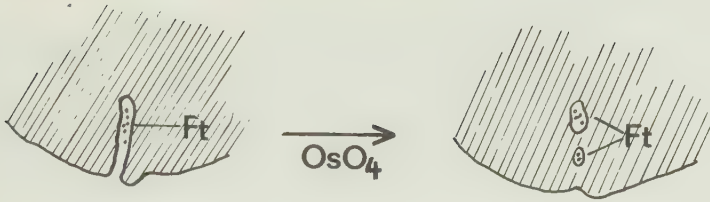
- Häufiges Waschen der Zellen vor der Inkubation könnte zu Zellmembran-Schädigungen und zu unspezifischen Anlagerungen an der Zelloberfläche führen. Nach Experimenten von Basten (1972) wurde nach beispielsweise 8maligem Waschen eine erhebliche Zunahme der markierten Zellen beobachtet. In unseren Versuchen wurden die Zellen bis zur Inkubation meist nur 3mal gewaschen.
  - Vor der Inkubation fixierte Zellen zeigen nach Smith (1961) eine geringere Markierung als solche, die erst nach der Inkubation fixiert werden. Die von uns ausgewerteten Ergebnisse sind von Versuchen, wo die Lymphocyten erst nach der Konjugat-Inkubation fixiert wurden.
- b) Ft, nur mit dem Kopplungsagens (z. B. Glutaraldehyd) verbunden, kann zu unspezifischen Anlagerungen führen (Stoltzner 1972). Bei der Fraktionierung des Konjugats durch Ultrazentrifugation können solche mit dem Kopplungsagens "beladenen" Ft-Moleküle nicht vom Konjugat getrennt werden, wohl aber weitgehend bei der Fraktionierung des Konjugats durch Säulenchromatographie, die von uns vorwiegend eingesetzt wurde.
- c) Die unspezifischen Anlagerungen können durch Eigenschaften der intakten Zellmembran bedingt sein.
- So binden nach Merler (1972) nicht immunisierte, menschliche Lymphocyten fremde (radioaktiv markierte) Proteine, die wahrscheinlich lediglich an die Zelloberfläche adsorbiert werden. Es ist denkbar, daß auch ein unspezifisches Ig eines Konjugats oder das Ft-Protein an die Zellmembran adsorbiert werden.
  - Frieß (1972) zeigte, daß mit Glutaraldehyd fixierte Lymphocyten (der Ratte) kolloidales Eisen an ihrer Oberfläche binden (die Inkubation erfolgte allerdings bei stark saurem pH). Die Partikel liegen in fast regelmäßigen Abständen nebeneinander.
- d) Möller (1961) meinte auf Grund seiner Experimente, daß gerade an der Oberfläche von solchen Zellen, die zur Ak-Synthese befähigt sind, relativ häufig unspezifische Markierungsreaktionen auftreten. Diese unspezifische Färbung

(bei Möller mit Fluorescein markierten Ak) war morphologisch nicht von spezifischen Reaktionen zu unterscheiden und war bei anderen Zelltypen nicht zu finden. Ebenso zeigten bei Davis (1968) v. a. Lymphocyten (und Monocyten) Anlagerungen von unspezifischen Ft-Ak-Konjugaten im Gegensatz zu anderen Blutzellen. Auch bei unseren Versuchen blieben beispielsweise die wenigen Granulocyten und Erythrocyten, die nach der Lymphocyten-Fraktionierung noch in der Zellsuspension waren, nahezu völlig frei von Ft-Anlagerungen. Es bleibt noch genau zu untersuchen, ob die bei Humanlymphocyten aufgetretenen unspezifischen Ft-Anlagerungen ausschließlich an Lymphocyten (und Monocyten) erscheinen.

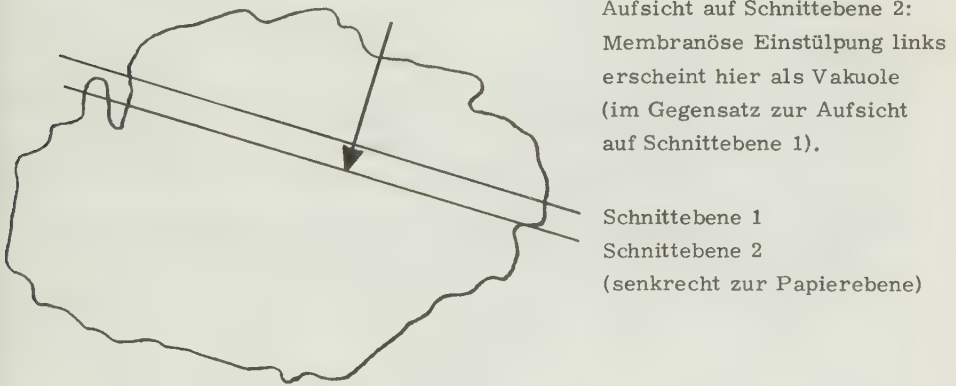
Wurden die Lymphocyten nur mit einer Ft-Lösung inkubiert, war das Ausmaß der intrazellulären Ft-Einschlüsse unabhängig von der Inkubationstemperatur ( $4^{\circ}$ , bzw.  $37^{\circ}$  C). Dagegen war nach der Inkubation mit dem spezifischen Konjugat die Anzahl der intrazellulären Ft-Partikel bei einer Inkubations-Temperatur von  $37^{\circ}$  C höher als bei einer Inkubations-Temperatur von  $4^{\circ}$  C.

Han (1966) zeigte, daß Lymphocyten in vivo Ft wenige Minuten nach der Injektion einlagern können. In vitro können mit Phytohämagglutinin stimulierte Lymphocyten zugesetzte Ft-Moleküle durch Pinocytose aufnehmen (Biberfeld 1971b). Auch nach der Inkubation bei 20 bis  $37^{\circ}$  C mit einem spezifischen Ft-Ak-Konjugat treten in Lymphocyten Ft-haltige Vakuolen auf (z. B. Taylor 1971, de Petris 1972); kleine pinocytotische Vesikeln können sogar bei einer Inkubations-Temperatur von  $4^{\circ}$  C beobachtet werden (Karnovsky 1972).

Bei unseren Versuchen waren intrazelluläre Ft-Partikel nach der Inkubation bei  $4^{\circ}$  C mit einer Ft-Lösung oder mit dem spezifischen Konjugat in mindestens 10 % der Lymphocyten zu finden, fast ausschließlich in membran-nahen Vakuolen (Abb. 5). Eine Aufnahme des Ft durch Pinocytose ist wegen der niedrigen Inkubations-Temperatur wenig wahrscheinlich. Membranöse Einstülpungen einer Lymphocyten-Oberfläche, der Ft angelagert ist, können durch die  $\text{OsO}_4$ -Fixierung so kollabieren, daß Vesikeln mit Ft-Einlagerungen entstehen (Tormey 1965). Solche membran-nahen Vesikeln können von solchen, wie sie durch Pinocytose entstehen, nicht immer unterschieden werden.



Zudem können Ft-besetzte Membran-Einstülpungen (also mit extrazellulärer Verbindung) bei bestimmten Schnittebenen wie Vakuolen mit Ft-Einschlüssen aussehen; bei Serienschnitten würde dann die extrazelluläre Verbindung dieser "Vakuolen" erscheinen (vgl. auch de Petris 1972).



## 6.2. KONJUGAT-ANLAGERUNG TROTZ VORINKUBATION MIT DEM SPEZIFISCHEN ANTIKÖRPER

Die Blockierung der Oberflächen-Ig mit dem spezifischen, ungekoppelten Ak vor der Inkubation mit dem spezifischen Konjugat brachte keine signifikant geringere Markierung der Lymphocyten-Membran. Davon ausgehend, daß maximal 50 bis 150.000 Ig-Moleküle an der Oberfläche eines Lymphocyten verteilt sind (Grey 1971, Rabellino 1971) haben wir trotz 100- bis 10.000fachen Über-

schoß an ungekoppelten Ak keine deutliche Blockierung der Oberflächen-Ig-Rezeptoren erreichen können.

Einige Autoren geben ebenfalls an, daß eine ausreichende Blockierung nicht möglich war. So erreichte Lee (1964) durch Vorinkubation von Humanerythrocyten mit unmarkierten Anti-H-Ig nur einen geringen Rückgang der Markierung durch das Konjugat. Ähnliche Ergebnisse bringen die Arbeiten von Davis (1968) und An (1972) unter Verwendung von Lymphocyten und Ft-Konjugaten.

| Autor                          | als Kontrollversuch:<br>- Blockierung mit dem<br>spez. ungekopp. Ak<br>- dann Inkubation mit<br>dem spez. Konjugat | Zellmembran                                                                      | Ergebnis                                                                 |
|--------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| An 1972                        | - anti-b <sub>4</sub> -Ak+(al)b <sub>4</sub> -IgG<br>- dann<br>(al)b <sub>4</sub> -IgG-Ft                          | b <sub>4</sub> -Kaninchen-<br>Lymphocyten mit<br>anti-b <sub>4</sub> -Ak beladen | 55 %<br>(aber nur ein<br>markiertes Ge-<br>biet pro mark.<br>Lymphocyt ) |
| Davis und<br>Silverman<br>1968 | - anti-H-2-Ak<br>- dann<br>anti-H-2-Ak-Ft                                                                          | Mäuse-Lympho-<br>cyten                                                           | "only a slight<br>reduction of<br>labeling"                              |
| de Petris<br>1972              | - anti-Maus-Ig-Ak<br>- dann<br>anti-Maus-IgG-Ak-Ft                                                                 | Mäuse-Lympho-<br>cyten                                                           | nur wenige<br>Ft-Moleküle                                                |

Um günstigere Ergebnisse zu erhalten, ist es wohl notwendig, bei der Vorinkubation ungekoppelte Ak in noch größerem Überschuß hinzuzufügen.

### 6.3. SPEZIFISCHE ANLAGERUNG DES KONJUGATS

Wie oben ausgeführt zeigen die Kontrollversuche in großem Ausmaß unspezifische Anlagerungen von Ft. Dadurch wird die Auswertung der spezifischen Markierung der Oberflächen-Ig erschwert. Es können nur soweit Aussagen über die Spezifität der Konjugat-Anlagerungen gemacht werden, als daß diese Anlagerungen sich meist von denen des ungekoppelten Ft unterscheiden. Die Art der Anlagerung war beim ungekoppelten Ft merklich verschieden von der des Konjugats. Die ungekoppelten Ft-Moleküle waren bevorzugt in vereinzelten

Aggregaten gehäuft, einzelne an der Oberfläche verteilte Moleküle waren hier selten (Abb. 3, 4); dagegen sah man das Ft-Ak-Konjugat häufiger in dieser Form der Zellmembran angelagert. Bei Inkubation mit spezifischem Ft-konjugierten Ak zeigten bis zu 9 % der Lymphocyten an ihrer Oberfläche eine kontinuierliche Schicht von Ft-Molekülen (Abb. 7, 8, 9). Eine ähnliche Art der Anlagerung war bei unspezifischen Inkubationslösungen sehr selten.

Der Mindestabstand der Ft-Partikel von der Zelloberfläche war unterschiedslos bei unspezifischen und bei spezifischen Ft-Anlagerungen ca.  $100 \text{ \AA}$  (vgl. auch Hämmerling 1968). Die gering elektronendichte, wolkige Schicht, innerhalb derer die Ft-Ak-Konjugate an der Zellmembran aufgereiht waren (Abb. 6, 7), fehlte nahezu bei den unspezifischen Kontrollversuchen, war aber teilweise an den "Kontroll"-Lymphocyten zu sehen, die vor dem Konjugat mit dem ungekoppelten spezifischen Ak inkubiert wurden. Karnovsky (1972) vermutet, daß diese Schicht die Ak darstellt.

War die Oberfläche eines Lymphocyten durch eine längere Reihe aufeinanderfolgender Ft-Ak-Konjugate markiert, betrug der Abstand zwischen den Ft-Molekülen (von Zentrum zu Zentrum) mindestens  $200 \text{ \AA}$ . Nimmt man an, daß dies auch der Abstand zwischen zwei Oberflächen-Ig ist und daß die Ig in gleicher Dichte über die gesamte Oberfläche verteilt sind, dann würde bei einem Querschnitt eines fixierten kleinen Lymphocyten von  $5 \text{ \mu m}$  (de Petris 1972) die so ermittelte Gesamtzahl an Oberflächen-Ig-Molekülen den von Grey (1971), Rabellino (1971), Engers (1973) u. a. angegebenen Anzahl von maximal 150.000 bis 160.000 pro Zelle nahekommen.

Die Ft-Ak-Konjugat-Markierung war in unseren Versuchen nicht gleichmäßig auf die gesamte Oberfläche verteilt. Daraus könnte man schließen, daß Immunrezeptoren vorwiegend bestimmte Loci besetzen und selten diffus über die gesamte Oberfläche verstreut sind (Hämmerling 1968, Aoki 1969). Allerdings lassen sich Zelloberflächen, die mit einem Ft-Ak-Konjugat diskontinuierlich markiert sind, manchmal mit Peroxydase-markierten Ak kontinuierlich anfärben (Bretton 1972). Es ist denkbar, daß Ig zwar auf der gesamten Zelloberfläche vorhanden sind, jedoch an verschiedenen Stellen in verschiedenen Konzentrationen. Orte mit hoher Ig-Konzentration könnten dann von Ft-Ak-Konjugaten

bevorzugt markiert werden.

Die mehr diffuse Verteilung der Ft-Ak-Konjugate an den Oberflächen der Lymphocyten fanden wir vorwiegend bei einer Inkubationstemperatur von  $4^{\circ}\text{C}$ ; bei höherer Inkubationstemperatur von z. B.  $20^{\circ}$  oder  $37^{\circ}$  waren die Ft-Ak-Konjugat-Anlagerungen bei mehreren Zellen auf eine Stelle der Zelloberfläche konzentriert (s. auch Karnovsky 1972, de Petris 1972, Unanue 1972). Bei höheren Inkubationstemperaturen zeigten sich intrazellulär relativ viele Ft-haltige Vakuolen und Lysosomen (Abb. 10). Möglicherweise gehen dabei Vakuolen in Lysosomen über (Biberfeld 1971a).

Der Großteil unserer Versuche mit spezifischen Ft-Ak-Konjugaten wurde bei einer Inkubationstemperatur von  $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Auch hier entstanden Vakuolen mit Ft-Einlagerungen, die möglichen Ursachen dieser Erscheinung wurden bereits unter 6.1. (e) besprochen.

Genaue quantitative Aussagen über die Anzahl der markierten Lymphocyten oder über die Anzahl von markierten Oberflächen-Ig können kaum gemacht werden, da die Kontrollversuche unspezifische Anlagerungen zeigten und es nicht völlig auszuschließen ist, daß diese unspezifischen Anlagerungen auch bei der Inkubation mit dem spezifischen Konjugat auftraten.

Trotzdem kann angenommen werden, daß die Markierung an der Zelloberfläche nach der Inkubation mit dem spezifischen Konjugat weitgehend spezifisch ist, da, wie bereits besprochen, die Art der Konjugat-Anlagerung sich von der des ungekoppelten Ft unterscheidet. Außerdem wurden bei der Inkubation mit einem Ft-gekoppelten Ak gegen Human-IgG ( $\gamma$ -kettenspezifisch) deutlich weniger Zellen markiert als (unter vergleichbaren Versuchsbedingungen) bei der Inkubation mit einem Ft-gekoppelten Ak gegen IgG (H-u.L-Kette). Wenn es sich bei der Markierung der Lymphocyten durch die spezifischen Konjugate um unspezifische Ft-Anlagerungen handeln würde, müßte der Grad der Markierung auch bei Konjugaten verschiedener Spezifität annähernd gleich sein, was jedoch nicht der Fall war.

Spezifische, an Ft gekoppelte Ak führen also zu spezifischen Markierungen an der Lymphocyten-Oberfläche. Ungekoppeltes Ft kann unspezifische Anlagerun-

gen ergeben. Auf Grund des oben Gesagten kann angenommen werden, daß bei einem Ft-Ak-Konjugat die Immunreaktion zwischen diesem Ak und dem Oberflächen-Ig schneller abläuft als die unspezifische Anlagerung von Ft an die Zelloberfläche. Die zwischen dem Ft-markierten Ak und dem Ig-Rezeptor entstandene Bindung scheint stabiler zu sein als die "Bindung" zwischen dem (ungekoppelten) Ft und der Zelloberfläche, sonst wäre zu erwarten, daß auch bei einem Ft-Ak-Konjugat das Ft sich vorwiegend unspezifisch anlagert und nicht, wie wir oben gesehen haben, der Ak mit dem Immunrezeptor reagiert.

Unsere Beobachtung, daß an Ft konjugierte Ak gegen schwere Ketten auffallend weniger markieren als Ak gegen schwere und leichte Ketten, steht in Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Autoren (Coombs 1969, Asamer 1972, Huber 1972). Die höhere Wirksamkeit von markierten Ak gegen IgG(H-u.L-Ketten) läßt sich vielleicht dadurch erklären, daß eventuell die F(ab)-Fragmente aus der Lymphocytenmembran hervorragen (Huber 1972, Fröland 1972) und so für diese Ak besonders gut "zugänglich" sind.

Zusammenfassend kann man sagen, daß spezifische Markierungen mit spezifischen Ak-Ft-Konjugaten an der Oberfläche von Human-Lymphocyten möglich waren, daß allerdings v. a. die quantitative Auswertung dieser Befunde eingeschränkt wurde durch die in den Kontrollversuchen beobachteten unspezifischen Ft-Anlagerungen.

## 7. BEURTEILUNG DER ANWENDUNGSMÖGLICHKEITEN VON Ft-Ak-KONJUGATEN IN DER IMMUN - ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Im folgenden wird auf der Grundlage der oben beschriebenen und diskutierten Versuche zusammenfassend erläutert, welche Methode der Ft-Ak-Konjugat-Herstellung wir für die geeignetste halten und v. a., welche Möglichkeiten wir für die Anwendung dieser Ft-Ak-Konjugate bei der Lokalisierung von intrazellulären Ig und von Oberflächen-Ig sehen.

### 7.1. GEEIGNETE METHODE DER Ft-Ak-KONJUGAT-HERSTELLUNG

Bei der Herstellung von Ft-Ak-Konjugaten zeigte sich, daß die Methode, bei der GA als Kopplungsagens eingesetzt wird, mehrere Vorteile aufweist gegenüber den anderen von uns angewandten Methoden mit TDI und mXDI als Kopplungsagens:

- a) Während der Konjugat-Herstellung entstehen keine Präcipitate (im Gegensatz zu mXDI).
  - b) Die Ak-Aktivität bleibt während des Kopplungsvorgangs gut erhalten (im Gegensatz zu TDI und mXDI).
  - c) Die Ausbeute an konjugiertem Ig im Konjugat ist höher als z. B. bei mXDI als Kopplungsagens.
  - d) Material- und Zeitaufwand sind gering, die Methode ist leicht reproduzierbar.
- Als Nachteil kann eventuell angesehen werden, daß bei Verwendung von GA mehrere Ig-Moleküle an ein Ft-Molekül konjugiert werden als bei Verwendung von mXDI; dadurch nimmt die Größe der Ft-Ak-Konjugate zwar zu, stört aber zumindest bei der Markierung von Oberflächen-Ig kaum.

Zusammenfassend kann man sagen, daß bei der Herstellung von Ft-Ak-Konjugaten GA als Kopplungsagens geeigneter ist als die Kopplungsagentien TDI und mXDI.

## 7.2. ANWENDBARKEIT VON Ft-Ak-KONJUGATEN ZUR LOKALISIERUNG VON INTRAZELLULÄREM Ig

Die Verwendung von Ft-markierten Ak zur Lokalisierung von intrazellulärem Ig hat im wesentlichen drei Vorteile:

- a) Die Ft-Ak-Konjugate sind im Elektronenmikroskop als einzelne Partikel deutlich zu sehen.
- b) Die Markierung von Ig durch Ft-Ak-Konjugate läßt sich quantitativ genau erfassen.
- c) Im Vergleich zu Peroxydase-markierten Ak eignen sich für myeloische Zellen Ft-Ak-Konjugate besser, weil die endogene Peroxydase-Aktivität bei der Auswertung stören kann.

Allerdings zeigen sich folgende Nachteile:

- a) Das große Ft-Molekül ist für die Zellmembran impermeabel, deshalb müssen die Zellen erst beschädigt werden um das Eindringen der Ft-Ak-Konjugate zu ermöglichen.
- b) Die Kontrollversuche (z. B. ungekoppeltes Ft oder unspezifisches Konjugat als Inkubationslösung) zeigen deutlich unspezifische Markierungen, die nicht immer von den spezifischen Anlagerungen unterschieden werden können.

Zusammenfassend stellen wir fest, daß es für die Lokalisierung von intrazellulärem Ig vorzuziehen ist, statt Ft niedermolekulare Tracer an Ak zu koppeln, damit eine Zellschädigung zur Erhöhung der Permeabilität nicht mehr notwendig ist. V. a. aber stören die in den Kontrollversuchen auftretenden unspezifischen intrazellulären Einlagerungen. Deshalb sind die Anwendungsmöglichkeiten von Ft-Ak-Konjugaten für die intrazelluläre Ig-Lokalisierung sehr beschränkt.

## 7.3. ANWENDBARKEIT VON Ft-Ak-KONJUGATEN ZUR LOKALISIERUNG VON OBERFLÄCHEN-Ig

Ft-Ak-Konjugate eignen sich für die Lokalisierung von Ig-Rezeptoren an Zelloberflächen; die Vorteile, die eine solche Anwendung bringt, sind im wesent-

lichen dieselben wie sie oben unter 7.2. genannt werden (genaue Lokalisierung, quantitative Erfäßbarkeit, Vorzug gegenüber Peroxydase-markierten Ak).

Als Nachteil sind die in den Kontrollversuchen (z. B. ungekoppelten Ft als Inkubationslösung) aufgetretenen unspezifischen Anlagerungen zu nennen, die sich aber in der Art der Anlagerung von den spezifischen Markierungen differenzieren lassen.

Eine quantitative Auswertung der Markierung durch spezifische Ft-Ak-Konjugate wird aber durch die unspezifischen Anlagerungen erschwert.

Zusammenfassend läßt sich folgendes feststellen:

Eine Reihe von Versuchen mit variierten Versuchsbedingungen (Anzahl der Waschvorgänge, Inkubationstemperatur, Albuminzusatz, Lymphocyten-Fraktionierung nach verschiedenen Methoden) zeigte eindeutig, daß sich Ft unspezifisch den Oberflächen von Humanlymphocyten anlagert. Von den meisten anderen Untersuchern wurden (allerdings unter Verwendung von tierischen Lymphocyten) Kontrollversuche mit ungekoppelten Ft als Inkubationslösung entweder nicht durchgeführt oder es fehlte eine quantitative Auswertung.

Für die Auswertung der spezifischen Markierungen ist es unumgänglich, daß

- a) parallel zu den Hauptversuchen Kontrollen mit ungekoppelten Ft als Inkubationslösung durchgeführt werden und daß
- b) die unspezifischen Anlagerungen dieser Kontrollen quantitativ erfaßt werden.

Unter Berücksichtigung dieser Kontrollen eignen sich spezifische Ft-Ak-Konjugate zur Markierung von Oberflächen-Ig, zumal die spezifischen Markierungen sich morphologisch von den unspezifischen Anlagerungen differenzieren lassen.

## 8. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Darstellung von intrazellulären Immunglobulinen und von Oberflächen-Immunglobulin-Rezeptoren im Elektronenmikroskop werden mit Hilfe eines Kopplungsagens spezifische Antikörper mit dem elektronendichten Protein Ferritin markiert. Die Brauchbarkeit einiger Kopplungsagentien für die Antikörper-Ferritin-Konjugat-Herstellung wird untersucht, v. a. im Hinblick auf den Erhalt der Antikörper-Aktivität im Konjugat.

Mit spezifischen Antikörper-Ferritin-Konjugaten lassen sich intrazelluläre Immunglobuline beim experimentellen Plasmocytom der Maus lokalisieren. Dabei finden sich Antikörper-Ferritin-Konjugate v. a. im endoplasmatischen Retikulum, weniger im perinukleären Raum, an Ribosomen und im freien Cytoplasma.

Immunglobulin-Rezeptoren an der Oberfläche von Humanlymphocyten werden mit Ferritin-markierten anti-IgG (H- u. L-Kette)- und anti-IgG ( -kettenspezifisch)-Antikörper dargestellt. Die Verteilung der Antikörper-Ferritin-Konjugate an der Zelloberfläche wird beschrieben und ausgewertet. Die Auswertung der Versuche wird dadurch erschwert, daß ein großer Teil der Lymphocyten in Kontrollversuchen unspezifische Ferritin-Anlagerungen aufweist, die sich aber von spezifischen Markierungen differenzieren lassen; die möglichen Ursachen der unspezifischen Ferritin-Anlagerungen werden diskutiert.

Abschließend werden auf der Grundlage unserer Versuche die Anwendungsmöglichkeiten von Ferritin-Antikörper-Konjugaten in der Immun-Elektronenmikroskopie beurteilt.

# 9. LITERATURVERZEICHNIS

1. Almeida, J., Cinader, B. and The structure of antigen-antibody  
Howatson, A.: complexes. J. Exp. Med. 118, 327 (1963).
2. Amstey, M.S.: Purification of ferritin-conjugated anti-  
body by DEAE-cellulose chromatography.  
J. Lab. clin. Med. 69, 997 (1967).
3. An, T., Miyai, K. and Electron microscopic localization of  
Sell, S.: rabbit immunoglobulin allotype b<sub>4</sub> on  
blood lymphocytes by an indirect ferritin  
immune complex labeling technique.  
J. Immunol. 108, 1271 (1972).
4. Anderson, P.J.: Purification and quantitation of glutaral-  
dehyde and its effect on several enzyme  
activities in skeletal muscle. J. Histochem.  
Cytochem. 15, 652 (1967).
5. Andres, G.A., Accini, L., Electron microscopic studies of human  
Hsu, K. C., Zabriskie, J. B. glomerulo-nephritis with ferritin-con-  
and Seegal, B. C.: jugated antibody. J. Exp. Med. 123, 399  
(1966).
6. Andres, G.A., Hsu, K. C. and Immunoferritin technique for the identi-  
Seegal, B. C.: fication of antigens by electron micro-  
scopy. In: Handbook of Experimental  
Immunology, ed. by Weir, D. M.,  
Blackwell Scientific Publications (1967).
7. Aoki, T., Hämmerling, V., Antigenic structure of cell surface, an  
de Harven, E., Boyse, E. A. immunoferritin study of the occurrence and  
and Old, L. J.: topography of H-2',  $\theta$  and TL allo-anti-  
gens on mouse cells. J. Exp. Med. 130,  
979 (1969).
8. Asamer, H.: Zur immunzytologischen Charakterisie-  
rung immunkompetenter Lymphocyten.  
Wiener klin. Wschr. 84, 401 (1972).
9. Avrameas, S. and Uriel, J.: Immunoenzyme technique: enzymes as  
markers for the localization of antigens  
and antibodies. Compt. Rend. 262, 2543  
(1966).
10. Avrameas, S. and Bouteille, Ultrastructural localization of antibody  
M.: by antigen label with peroxidase. Exp.  
Cell Res. 53, 166 (1968).

11. Avrameas, S. Taudou, B. and Chuilon, S.: Glutaraldehyde, Cyanuric Chloride and Tetraazotized o-Dianisidine as coupling reagents in the passive hemagglutination test. *Immunochem.* 6, 67 (1969).
12. Avrameas, S.: Immunoenzyme techniques: Enzymes as markers for the localization of antigens and antibodies. *Int. Rev. Cytol.* 27, 349 (1970a).
13. Avrameas, S. and Leduc, E.H.: Detection of simultaneous antibody synthesis in plasma cells and specialized lymphocytes in rabbit lymph nodes. *J. Exp. Med.* 131, 1137 (1970 b).
14. Bankhurst, A.D., Warner, N.L. and Sprent, J.: Surface immunoglobulins on thymus and thymus-derived lymphoid cells. *J. Exp. Med.* 134, 1005 (1971).
15. Basten, A., Warner, N.L., and Mandel, T.: A receptor for antibody on lymphocytes. II. Method of detection and functional significance. *J. Exp. Med.* 135, 610 (1972).
16. Baumal, R., Potter, M. and Scharff, M.D.: Synthesis, assembly and secretion of gamma-globulin by mouse myeloma cells. III. Assembly of the three subclasses of IgG. *J. Exp. Med.* 134, 1316 (1971).
17. Berenbaum, M.C.: The autoradiographic localization of intracellular antibody. *Immunol.* 2, 71 (1959).
18. Bhoopalam, N., Yakulis, V., Costea, N. and Heller, P.: Surface immunoglobulins of circulating lymphocytes in mouse plasmocytoma. II. The influence of plasmocytoma RNA on surface immunoglobulins of lymphocytes. *Blood*, 39, 465 (1972).
19. Biberfeld, P.: Endocytosis and lysosome formation in blood lymphocytes transformed by phytohemagglutinin. *J. Ultrastruct. Res.* 37, 41 (1971 a).
20. Biberfeld, P.: Uropod formation in phytohemagglutinin stimulated lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 66, 433 (1971b).
21. Borek, F. and Silverstein, A.M.: Characterization and purification of ferritin-antibody globulin conjugates. *J. Immunolog.* 87, 555 (1961).

22. Bouteille, M.: Protein renewal in anti-peroxidase anti-body forming cells. II. Combination of ultrastructural immunocytochemistry and autoradiography in "pulse-chase" experiments. *Exp. Cell Res.* 69, 135 (1971).
23. Bretton, R., Ternynck, T. and Avrameas, S.: Comparison of peroxidase and ferritin labelling of cell surface antigens. *Exp. Cell Res.* 71, 145 (1972).
24. Ciresa, M. und Huber, H.: Die Isolierung funktionsfähiger Blut-lymphocyten. *Acta haemat.* 38, 300 (1967).
25. Coombs, R.R.A., Feinstein, A., and Wilson A.B.: Immunoglobulin determinants on the surface of human lymphocytes. *Lancet* 2-2, 1157 (1969).
26. Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. and Berliner, E.: The demonstration of pneumococcal antigens in tissue by use of fluorescent antibody. *J. Immunol.* 45, 159 (1942).
27. Coons, A.H., Leduc, E.H. and Connally, J.M.: Studies on antibody-production. I. A method for the histochemical demonstration of specific antibody and its application to a study of the hyperimmune rabbit. *J. Exp. Med.* 102, 49 (1955).
28. Davis, W.C. and Silverman, N.: Localization of mouse H-2 histo-compatibility antigen with Ferritin-labelled antibody. *Transplantation* 6, 535 (1968).
29. Easton, J.M., Goldberg, B. and Green, H.: Immun cytotoxicity: electron microscopic localization of cellular antigens with ferritin-antibody conjugates. *J. Exp. Med.* 115, 275 (1962).
30. Ebbesen, P., Schiødt, T. and Christensen, H.E.: An electron microscopic examination of murine plasma cell neoplasms with and without paraproteinemia. *Cancer Res.* 29, 1851 (1969).
31. Engers, H.D. and Unanue, E.R.: The fate of anti Ig-surface complexes on B-lymphocytes. *J. Immunol.* 110, 465 (1973).

32. Fahimi, H.D. et Drochmans, P.: Essais de standardisation de la fixation au glutaraldéhyde. I. Purification et détermination de la concentration du glutaraldéhyde. J. Microscopie 4, 725 (1965).
33. Fahimi, H.D. and Drochmans, P.: Purification on Glutaraldéhyde, its significance for preservation of acid phosphatase activity. J. Histochem. Cytochem. 16, 199 (1968).
34. Farrant, J.L.: An electron microscopic study of Ferritin. Biochem. biophysica acta 13, 569 (1954).
35. Frieß, A.E. und Liebich, H.G.: Ultrahistochemische Untersuchungen an der Glykokalyx von Lymphocyten aus dem Ductus thoracicus der Ratte. Z. Zellforschung 134, 143 (1972).
36. Fröland, S.S. and Natvig, J.B.: Class, subclass and allelic exclusion of membrane-bound Ig of Human B-lymphocytes. J. Exp. Med. 136, 409 (1972).
37. van Furth, R.: The formation of immunoglobulins by circulating lymphocytes. Seminars in hematology 6.1, 84 (1969).
38. Gonatas, N.K., Antoine, J.-C., Stieber, A. and Avrameas, S.: Surface immunoglobulins of thymus and lymph node cells demonstrated by the peroxydase coupling technique. Lab. Invest. 26, 253 (1972).
39. Grabar, P. et Williams, C.A.: Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines: application au sérum sanguin. Biochem. biophysica acta 10, 193 (1953).
40. Granick, S.: Ferritin: I. Physical and chemical properties of horse spleen ferritin. J. Biol. Chem. 146, 451 (1942).
41. Grey, H.M., Rabellino, E., and Pirofsky, B.: Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. IV. Distribution in hypogammaglobulinemia, cellular deficiency, and chronic lymphatic leucamia. J. Clin. Invest. 50, 2368 (1971).

42. Hajdu, I., Holub, M. and Trebichavsky, I.: The sequence of appearance of antibodies in mouse omentum plasma cells. *Exp. Cell Res.* 75, 219 (1972).
43. Hämmerling, U., Aoki, T., de Harven, E., Boyse, E. A. and Old, L. J.: Use of hybrid antibody with anti-  $\gamma$  -G and anti-Ferritin specificities in locating cell surface antigens by electron microscopy. *J. Exp. Med.* 128, 1461 (1968).
44. Hämmerling, U., Aoki, T., Wood, H. A., Old, L. J., Boyse, E. A. and de Harven, E.: New visual markers of antibody for electron microscopy. *Nature* 223, 1158 (1969).
45. Han, S. S. and Johnson, A. G.: Radiographic and electron microscopic evidence of rapid uptake of antigen by lymphocytes. *Science* 153, 176 (1966).
46. Harrison, P. M.: The structures of Ferritin and Apoferritin: some preliminary X-ray study. *J. Molecular Biol.* 1, 69 (1959).
47. Harrison, P. M.: The structure of apoferritin: Molecular size, shape and symmetry from X-ray data. *J. Molecular Biol.* 6, 404 (1963).
48. Harrison, P. M.: Ferritin and haemosiderin, in: *Iron metabolism, an international symposium*, ed. by Gross, F., Springer Verlag Berlin, 40 - 59 (1964).
49. Hofmann, T. and Harrison, P. M.: The structure of Apoferritin: Degradation into molecular weight of subunits. *J. Molecular Biol.* 6, 256 (1963).
50. Hsu, K. C., Rifkind, R. A. and Zabriskie, J. B.: Fluorescent, electron microscopic and immunoelectrophoretic studies of labeled antibodies. *Science* 142, 1471 (1963).
51. Huber, H., Winkler, H., Reiser, G., Huber, C., Gabl, F. und Braunsteiner, H.: Eigenschaften und subcelluläre Lokalisation neugebildeter Proteine menschlicher Lymphocyten in vitro mit und ohne Phytohämagglutininzusatz. *Klin. Wschr.* 45, 204 (1967).

52. Huber, H., Michlmayr, G., Asamer, H., Huber, C., und Braunsteiner, H.: Die Differenzierung menschlicher Blutlymphocyten mit immunologischen und autoradiographischen Methoden. I. Ergebnisse bei Normalpersonen und bei Patienten mit chronischer Lymphadenose. *Klin. Wschr.* 50, 504 (1972).
53. Isliker, H., Le Maire, B. and Morgan, C.: The use of ferritin-conjugated antibody-fragments in electron microscopic studies of viruses. *Path. Microbiol.* 27, 521 (1964).
54. Karnovsky, M.J., Unanue, E.R., and Leventhal, M.: Ligand-induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. II. Mapping of surface moieties. *J. Exp. Med.* 136, 907 (1972).
55. Leduc, E.H., Avrameas, S. and Bouteille, M.: Ultrastructural localization of antibody in differentiating plasma cells. *J. Exp. Med.* 127, 109 (1968).
56. Leduc, E.H., Scott, G.B. and Avrameas, S.: Ultrastructural localization of intracellular immune globulins in plasma cells and lymphoblasts by enzyme-labeled antibodies. *J. Histochem. Cytochem.* 17, 211 (1969).
57. Lee, R.E. and Feldman, J.D.: Visualization of antigenic sites of human erythrocytes with ferritin-antibody conjugates. *J. Cell Biology* 23, 396 (1964).
58. Merler, E. and Silberschmidt, M.: Uptake of antigen by human lymphocytes. *Immunology* 22, 821 (1972).
59. Metzger, J.F. and Smith, C.W.: The application of electron microscopy to the demonstration antigenic sites in biologic system. *Lab. Invest.* 11, 902 (1962).
60. Möller, G.: Demonstration of mouse isoantigens at the cellular level by the fluorescent antibody technique. *J. Exp. Med.* 114, 415 (1961).
61. Morgan, C., Rifkind, R.A., Hsu, C.R. Holden, M., Seegal, B.C. and Rose, M.H.: Electron microscopic localization of intracellular viral antigen by the use of ferritin-conjugated antibody. *Virology* 14, 292 (1961).

62. Morgan, C.: The use of ferritin-conjugated antibodies in electron microscopy. *Int. Rev. Cytol.* 32, 291 (1972).
63. Nakane, P.K. and Pierce, G.B.: Enzyme-labeled antibodies for the light and electron microscopic localization of tissue antigens. *J. Histochem. Cytochem.* 14, 929 (1966).
64. Neauport-Sautes, C. and Silvestre, D.: Ferritin-antibody coupling with glutaraldehyde. *Transplantation* 13, 536 (1972).
65. Onkelinx, E., Meuldermans, W., Joniau, M. and Lontie, R.: Glutaraldehyde as a Coupling reagent in passive haemagglutination. *Immunology* 16, 35 (1969).
66. Otto, F. und Schmid, D.O.: Lymphocytenisolierung aus dem Blut des Menschen und der Tiere. *Blut* XXI, 118 (1970).
67. Ouchterlony, O.: Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Progress Allergy* 5, 1 (1958).
68. Parson, D.F., Darden, E.B., Lindsley, D.L., Pratt, G.T. and Edwards, M.P.: Electron microscopy of plasma cell tumors of the mouse. I. MPC-1 and x5563 tumors. *J. Biophys. biochem. Cyt.* 9, 353 (1961).
69. Pepe, F.A.: The use of specific antibody in electron microscopy. I. Preparation of mercury labeled antibody. *J. Biophys. Biochem. Cyt.* 11, 515 (1961).
70. Perkins, W.D., Karnovsky, M.J. and Unanue, E.R.: An ultrastructural study of lymphocytes with surface-bound immunoglobulin. *J. Exp. Med.* 135, 267 (1972).
71. Pernis, B., Forni, L. and Amante, L.: Immunoglobulins as cell receptors. *Annals New York Academy of Sciences*, 420 (1971).
72. de Petris, S., Karlsbad, G., and Pernis, B.: Localisation of antibodies in plasma cells by electron microscopy. *J. Exp. Med.* 117, 849 (1963).

73. de Petris, S. and Karlsbad, G.: Localisation of antibodies by electron microscopy in developing antibody producing cells. *J. Cell. Biology* 26, 759 (1965).
74. de Petris, S. and Raff, M. C.: Distribution of immunoglobulins on the surface of mouse lymphoid cells as determined by immunoferritin electron microscopy. Antibody-induced, temperature dependent redistribution and its implications for membrane structure. *Eur. J. Immunol.* 2, 523 (1972).
75. Potter, M. and Fahey, J. L.: Studies on eight transplantable plasma-cell neoplasms of mice. *J. Nat. Canc. Inst.* 24, 1153 (1960a).
76. Potter, M. and Robertson, C. L.: Development of plasma cell neoplasms in BALB/c mice after intraperitoneal injection of paraffin-oil adjuvant, heat-killed staphylococcus mixtures. *J. Nat. Canc. Inst.* 25, 847 (1960 b).
77. Rabellino, E., Colon, S., Grey, H. M. and Unanue, E. R.: Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. I. Distribution and quantitation. *J. Exp. Med.* 133, 156 (1971).
78. Rabinowitz, Y.: Separation of lymphocytes, polymorphonuclear leucocytes and monocytes on glass columns, including tissue culture observations. *Blood* 23, 811 (1964).
79. Richards, F. M. and Knowles, J. K.: Glutaraldehyde as a protein cross linking reagent. *J. Molec. Biol.* 37, 231 (1968).
80. Rifkind, R. A., Hsu, K. C., Morgan, C., Seegal, B. C., Knox, A. W. and Rose H. M.: Use of ferritin-conjugated antibody to localize antigen by electron microscopy. *Nature* 187, 1094 (1960).
81. Rifkind, R. A., Ossermann, E. F., Hsu, K. C. and Morgan, C.: The intracellular distribution of  $\gamma$ -Globulin in a mouse plasma cell tumor (x5563) as revealed by fluorescence and electron microscopy. *J. Exp. Med.* 116, 423 (1962).
82. Rifkind, R. A., Hsu, K. C., and Morgan, C.: Immunochemical staining for electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.* 12, 131 (1964).

83. Saito, K., Uda, H., Mori, T., Miyamoto, K., Takenaka, T. and Nagai, K.: Ultrastructural study on antibody-forming cells to horse radish peroxidase. *Exp. Cell Res.* 76, 127 (1973).
84. Schäfer, H.: Immunelektronenmikroskopie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1971).
85. Scheidegger, J.J.: Une micromethode de l'immune-électrophorèse. *Int. Arch. Allergy* 7, 103 (1955).
86. Sell, S., and Asofsky, R.: Lymphocytes and immunoglobulins. *Progr. Allergy* 12, 86 (1968).
87. Siess, E., Wieland, O. and Miller, F.: A simple method for the preparation of pure and active  $\gamma$ -Globulin-Ferritin conjugates using Glutaraldehyde. *Immunology* 20, 659 (1971).
88. Singer, S.J.: Preparation of an electron-dense antibody conjugate. *Nature* 183, 1523 (1959).
89. Singer, S.J. and Schick, A.F.: The properties of specific stains for electron microscopy prepared by the conjugation of antibody molecules with ferritin. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9, 519 (1961).
90. Smith, Ch.W. and Metzger, J.F.: "Pitfalls" in immune electron microscopy. *Experientia* 17, 394 (1961).
91. Sri Ram, J., Tawde, S.S., Pierce, G.G. and Midgley, A.R.: Preparation of antibody-ferritin conjugates for immuno-electron microscopy. *J. Cell Biology* 17, 673 (1963).
92. Stein, H. und Drescher, S.: Darstellung von Oberflächen-IgM an Blutlymphocyten mit der Immuno-Per-oxydase-Methode. *Blut* XXVI, 35 (1973).
93. Sternberger, L.A., Donati, E.J., Cuculis, J.J. and Petral, J.P.: Indirect immunouranium technique for staining of embedded antigen in electron microscopy. *Exp. Mol. Path.* 4, 112 (1965).
94. Sternberger, L.A.: Electron microscopic immunocytochemistry: a review. *J. Histochem. Cytochem.* 15, 139 (1967).

95. Stoltzner, G., Dzoga, K. and Wissler, R.W.: Electron microscopy of ferritin-labeled platelet-specific antibody. *Lab. Invest.* 27, 357 (1972).
96. Taylor, R.B., Duffus, W.P.H., Raff, M.C. and de Petris, S.: Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody. *Nature* 233, 225 (1971).
97. Tormey, J. Mc. D.: Artifactual localization of ferritin in the ciliary epithelium in vitro. *J. Cell Biology* 25, 1 (1965).
98. Unanue, E.R., Perkins, W.D. and Karnovsky, M.J.: Ligand-induced movement of lymphocyte membrane macromolecules. I. Analysis by immunofluorescence and ultrastructural radiography. *J. Exp. Med.* 136, 885 (1972).
99. Vivetta, E.S. and Uhr, J.W.: Cell surface immunoglobulin. Release from murine splenic lymphocytes. *J. Exp. Med.* 136, 676 (1972).
100. Vogt, A. und Kopp, R.: Loss of specific agglutinating activity of purified Ferritin-conjugated antibodies. *Nature* 202, 1350 (1964).
101. Wagner, M. und Wagner, B.: Glutaraldehyd als Kopplungsagens für die Herstellung ferritinmarkierter Antikörper. *Zbl. Bakt. Hyg. I, A* 221, 100 (1972).
102. Wellensiek, H.J. and Coons, A.H.: Studies on antibody production. IX. The cellular localization of antigen molecules (ferritin) in the secondary response. *J. Exp. Med.* 119, 685 (1964).
103. Williams, C.A., jr.: Immuno-electrophoresis. *Sci. Amer.* 202, 3, 130 (1960).
104. Wilson, J.D. and Nossal, G.J.V.: Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and in chronic lymphocytic leukemia. *Lancet* 788 (1971).







Abb. 1: Zelle eines experimentellen Plasmocytoms der Maus; hochentwickeltes endoplasmatisches Retikulum, V = Viren. Vergr. : 9.200 x

Abb. 2: Zelle eines experimentellen Plasmocytoms der Maus; eingefroren, aufgetaut und inkubiert mit spezifischem Ft-Ak-Konjugat. Reichlich endoplasmatisches Retikulum mit artifiziell erweiterten Lumina. Ft-Ak-Konjugate an der Wand des endoplasmatischen Retikulum und im anschließenden freien Cytoplasma (als Beispiel: Pfeil rechts), außerdem im perinukleären Raum (als Beispiel: Pfeil links). N = Nucleus, G = Golgi-Apparat, V = Viren. Vergr. 45.750 x



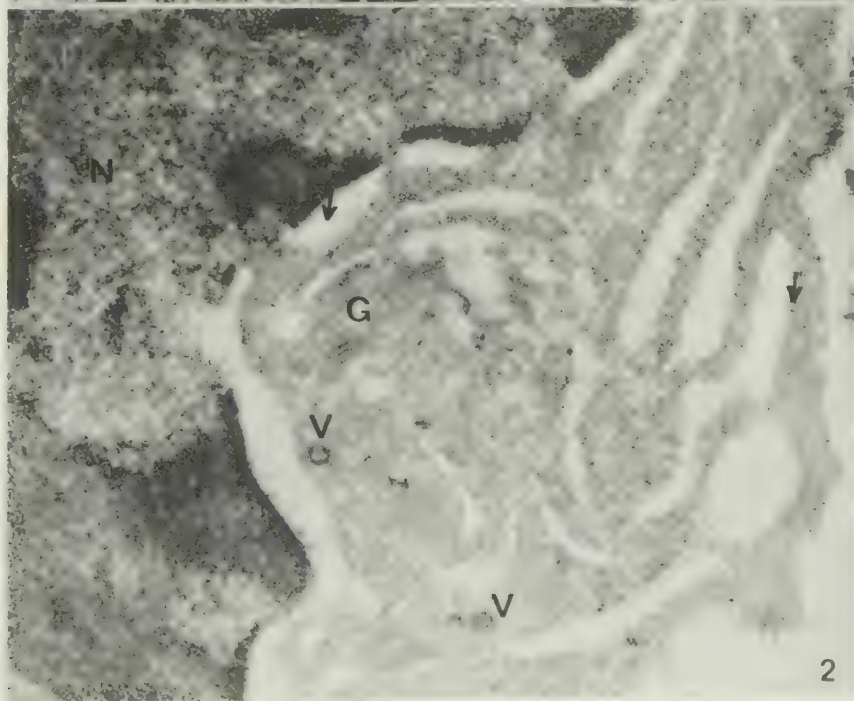
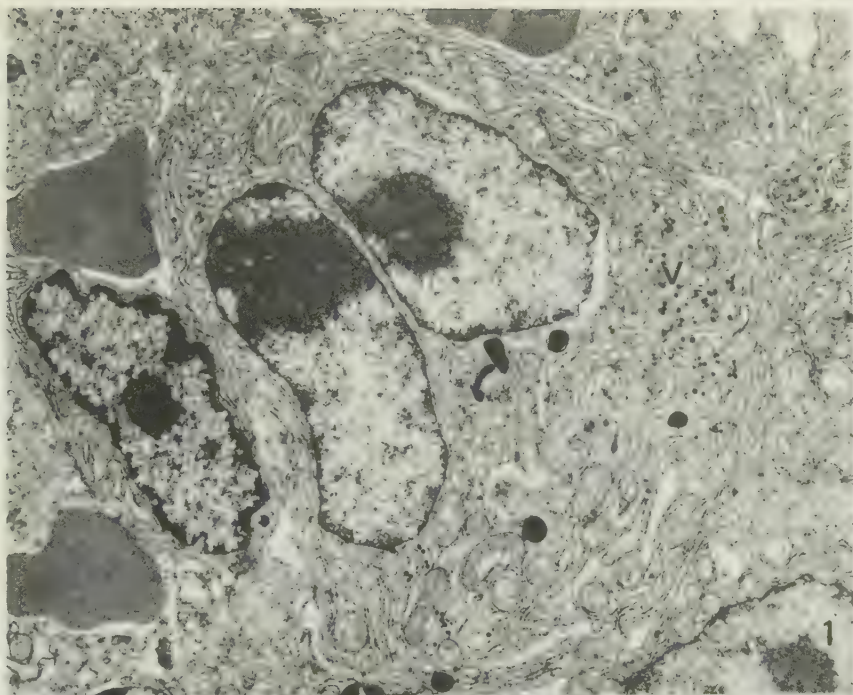




Abb. 3: Humanlymphocyt; Inkubation mit Ft-Lösung bei 37<sup>0</sup> C. An der Oberfläche unspezifische Ft-Anlagerungen in Form von nicht zusammenhängenden Aggregaten (Pfeile). Mikrovilliartige Fortsätze. L = Lysosom, M = Mitochondrium, Va = Ft-haltige Vacuole. Vergr.: 39.900 x



M

L

Va

↑

←

←

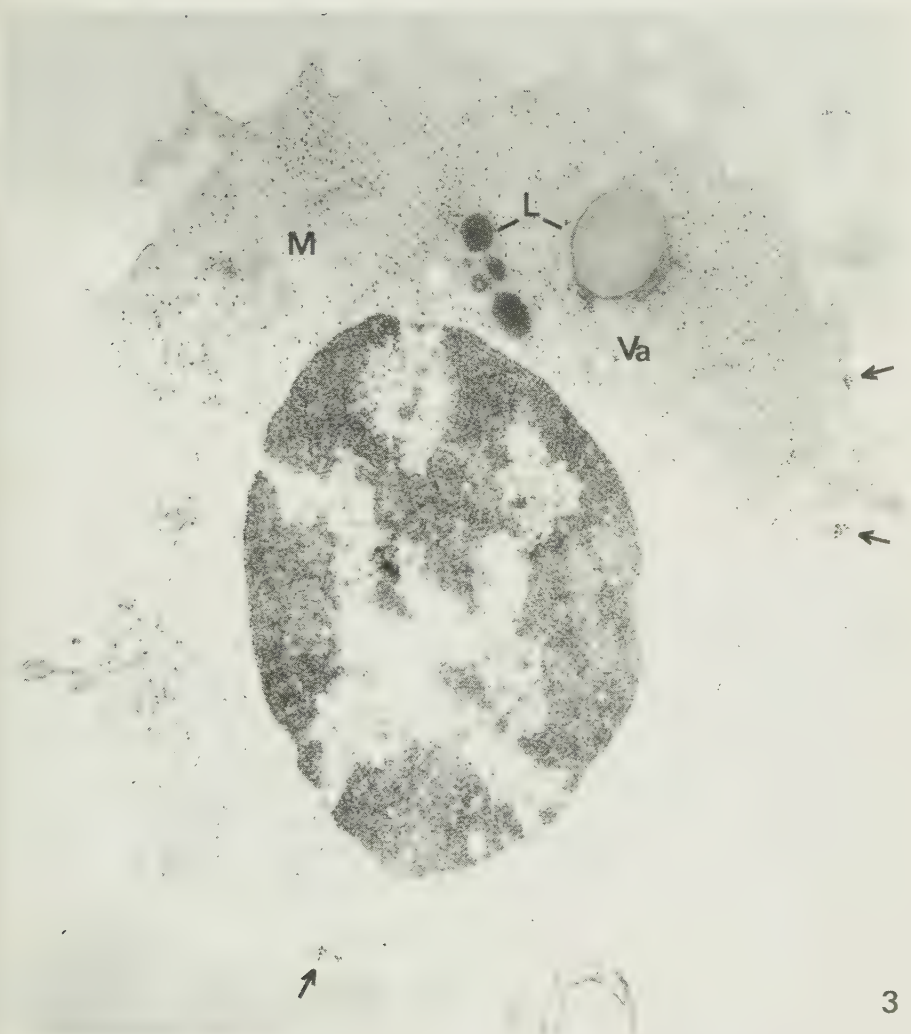




Abb. 4: Humanlymphocyt; Inkubation mit Ft-Lösung bei 37<sup>O</sup> C. Unspezifische Anlagerung von Ft-Aggregaten, mikrovilliartige Fortsätze. Vergr.: 78.000 x

Abb. 5: Humanlymphocyt; Inkubation mit Ft-Lösung bei 4<sup>O</sup> C, Albuminzusatz. Membrannahe Ft-haltige Vacuolen. Vergr.: 144.000 x



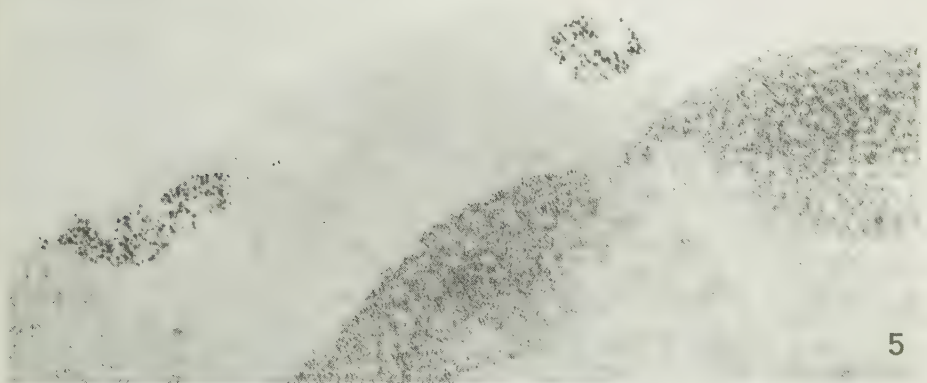
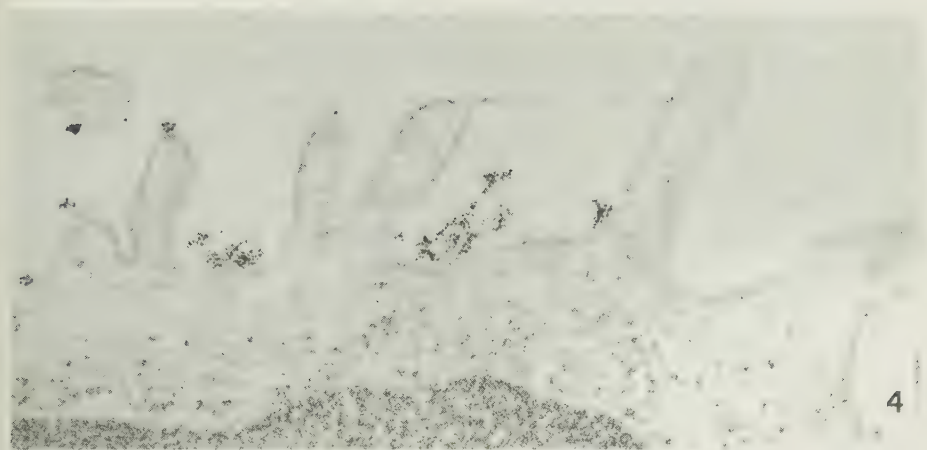




Abb. 6: Humanlymphocyt; Inkubation mit spezifischem Ft-Ak-Konjugat bei 4<sup>0</sup> C nach indirekter Methode. An der Oberfläche Ft-Ak-Konjugate innerhalb eines dichten, wolkigen Materials. N = Nucleus. Vergr.: 98.000 x

Abb. 7: Humanlymphocyt; Inkubation mit spezifischem Ft-Ak-Konjugat bei 4<sup>0</sup> C. Kontinuierliche Reihe von Ft-Ak-Konjugaten innerhalb eines dichten, wolkigen Materials. Vergr.: 136.000 x

Abb. 8: Humanlymphocyt; Inkubation mit spezifischem Ft-Ak-Konjugat bei 20<sup>0</sup> C. An der Oberfläche eine kontinuierliche, meist einreihige Schicht von Ft-Ak-Konjugaten. M = Mitochondrium. Vergr.: 252.000 x



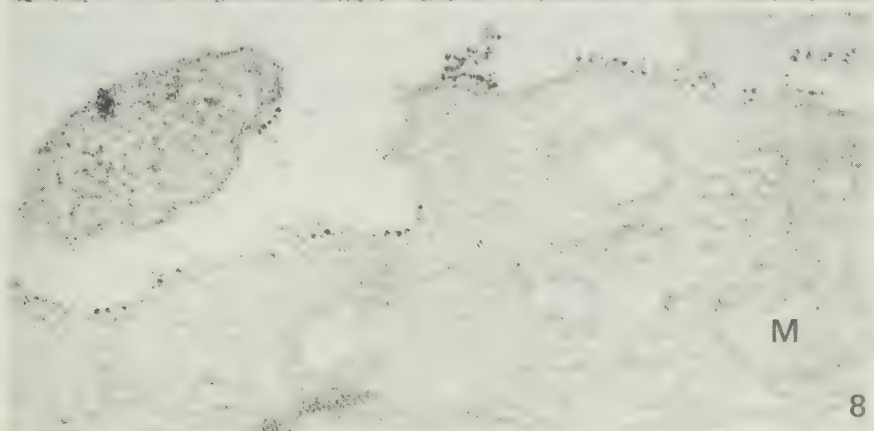
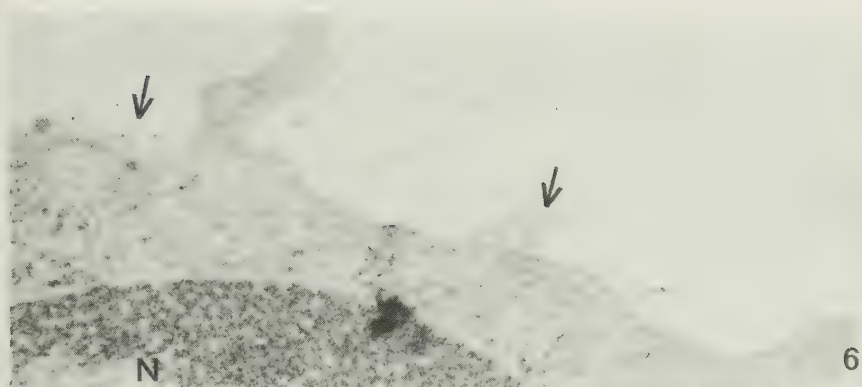
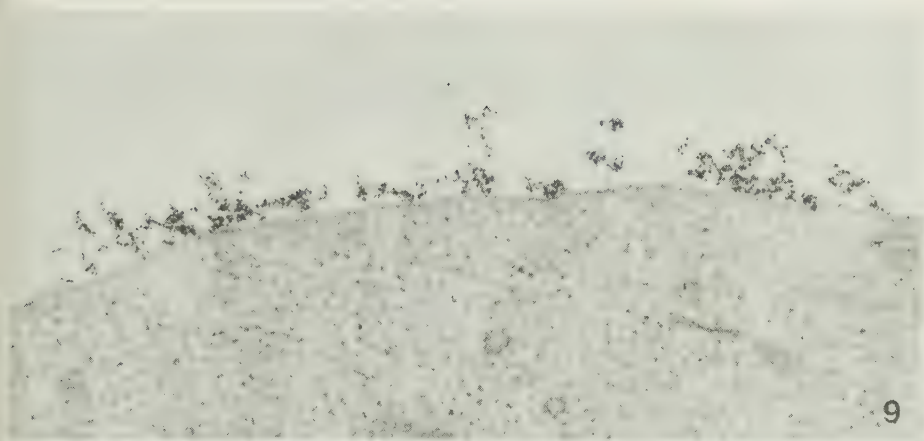




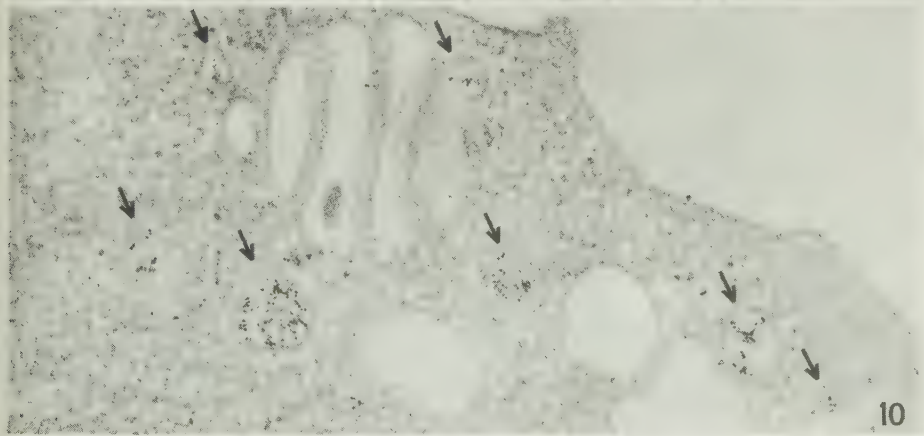
Abb. 9: Humanlymphocyt; Inkubation mit spezifischem Ft-Ak-Konjugat bei  $4^{\circ}\text{C}$  nach indirekter Methode. An der Oberfläche eine kontinuierliche, breite Schicht von Ft-Ak-Konjugaten. Vergr.: 80.000 x

Abb. 10: Humanlymphocyt; Inkubation mit spezifischem Ft-Ak-Konjugat bei  $37^{\circ}\text{C}$ . Zahlreiche Ft-haltige Vacuolen und Cytosomen (Pfeile). Vergr.: 108.800 x





9



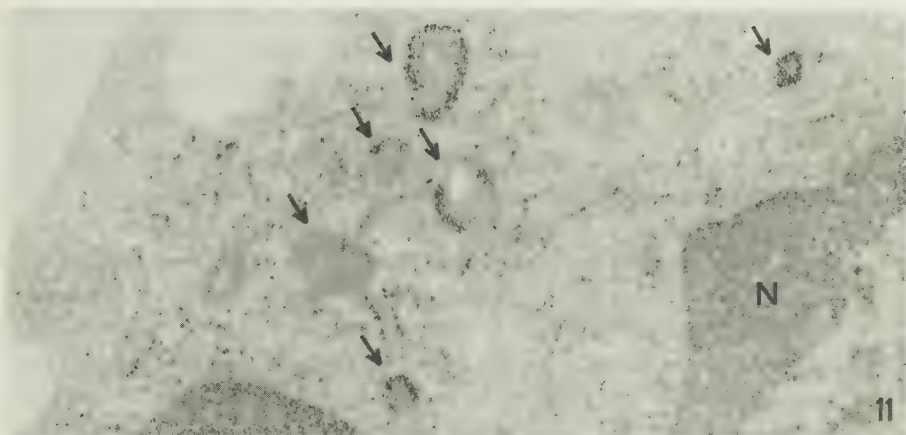
10



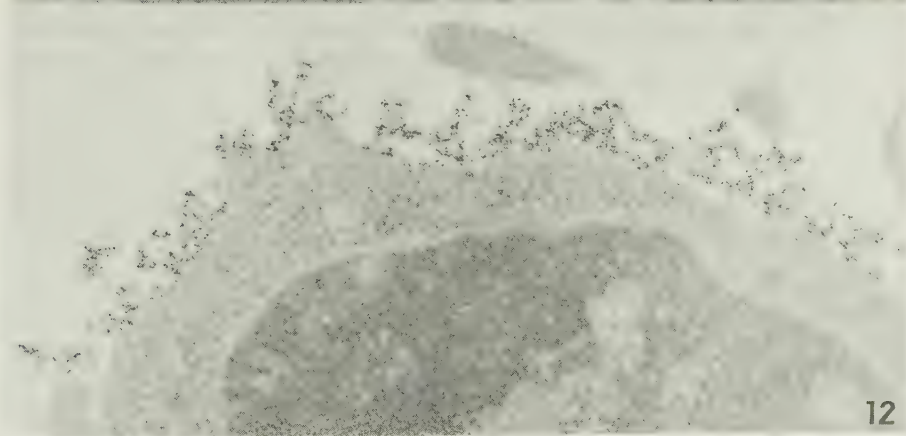
Abb. 11: Monocyt; Inkubation mit Ft-Lösung bei 37° C. Mehrere Ft-haltige Vacuolen und Cytosomen (Pfeile). Vergr.: 108.800 x

Abb. 12: Humanlymphocyt; Inkubation mit spezifischem Ft-Ak-Konjugat bei 4° C. Große, zusammenhängende Ft-Ak-Konjugat-Ansammlung an der Oberfläche. Vergr.: 64.700 x





11



12



## Lebenslauf

Am 23. August 1945 wurde ich, Josef Zehentbauer, als viertes Kind des Gärtners Dionys Zehentbauer und seiner Ehefrau Therese, geb. Buchner, in Mallersdorf geboren. Ab 1946 lebte ich bei meinen Pflegeeltern Walter und Maria Scupin in München. Seit 1967 bin ich mit Anne Zehentbauer, geb. Bischlager, verheiratet.

Von 1952 bis 1958 besuchte ich die Grundschule, anschließend sechs Jahre die Klenze-Oberrealschule in München bis zum Abschluß der sog. Oberstufen-Reife. 1964 begann ich eine Lehre als Verlagsbuchhändler im Wilhelm Fink Verlag München. 1967 legte ich die Kaufmannsgehilfen-Prüfung ab und beendete erfolgreich die Buchhändler-Lehre; danach war ich als Verlagsbuchhändler tätig. 1968 bestand ich nach dem Besuch der Abendrealschule für Berufstätige das sog. Begabtenabitur, das vom Bayerischen Staatsministerium für Unterricht und Kultus abgenommen wurde. Seit dem Wintersemester 1968/69 war ich an der Medizinischen Fakultät der Universität München immatrikuliert; im Sommersemester 1974 beendete ich mein Studium mit dem medizinischen Staatsexamen.













